

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

DANIEL DE LIMA BELLAN

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DE UMA GALACTANA SULFATADA
OBTIDA DA ALGA VERDE *Codium isthmocladum* EM MODELOS DE MELANOMA
MURINO

CURITIBA

2020

DANIEL DE LIMA BELLAN

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DE UMA GALACTANA SULFATADA
OBTIDA DA ALGA VERDE *Codium isthmocladum* EM MODELOS DE MELANOMA
MURINO

Tese de doutorado apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biologia Celular e Molecular, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Departamento de Biologia Celular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Edvaldo da Silva Trindade

CURITIBA

2020

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas
(Giana Mara Seniski Silva – CRB/9 1406)

Bellan, Daniel de Lima

Avaliação da atividade antitumoral de uma galactana sulfatada obtida da alga verde *Codium isthmocladum* em modelos de melanoma murino. / Daniel de Lima Bellan. – Curitiba, 2020.

157 p.: il.

Orientador: Edvaldo da Silva Trindade.

Tese (doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

1. Câncer. 2. Melanoma. 3. Polissacarídeos. 4. Metástase. 5. Imunomodulação. I. Título. II. Trindade, Edvaldo da Silva, 1971-. III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

CDD (22. ed.) 616.99477



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Departamento de Biologia Celular
Setor de Ciências Biológicas
Universidade Federal do Paraná

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Tese de Doutorado de DANIEL DE LIMA BELLAN intitulada “**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DE UMA GALACTANA SULFATADA OBTIDA DA ALGA VERDE CODIUM ISTHMOCLADUM EM MODELOS DE MELANOMA MURINO**”, sob orientação do Prof. Dr. Edvaldo da Silva Trindade, que após terem inquirido o aluno e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa. A outorga do título de Doutor está sujeita à homologação pelo Colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 29 de junho de 2020.

EDVALDO DA SILVA TRINDADE
Presidente da Banca examinadora

TÁRCIO TEODORO BRAGA
Avaliador Externo (UFPR)

Profa Dra Alexandra Acco
Pós graduação em Farmacologia UFPR
Nível Mestrado e Doutorado
Matrícula 144894

ALEXANDRA ACCO
Avaliador Externo (UFPR)

MAURO SÉRGIO GONÇALVES PAVÃO
Avaliador Externo (UFRJ)

ROGER CHAMMAS
Avaliador Externo (ICESP)



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Departamento de Biologia Celular
Setor de Ciências Biológicas
Universidade Federal do Paraná

ATA Nº471

ATA DE SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE DOUTORADO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

No dia vinte e nove de junho de dois mil e vinte, às 14:00 horas, na sala online, defesa remota, foram instaladas as atividades pertinentes ao rito de defesa de tese do doutorando **DANIEL DE LIMA BELLAN**, intitulada: **AValiação DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DE UMA GALACTANA SULFATADA OBTIDA DA ALGA VERDE CODIUM ISTHMOCLADUM EM MODELOS DE MELANOMA MURINO**, sob orientação do Prof. Dr. EDVALDO DA SILVA TRINDADE. A Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR da Universidade Federal do Paraná, foi constituída pelos seguintes Membros: EDVALDO DA SILVA TRINDADE (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ), TARCIO TEODORO BRAGA (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ), ALEXANDRA ACCO (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ), MAURO SÉRGIO GONÇALVES PAVÃO (UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO), ROGER CHAMMAS (INSTITUTO DO CÂNCER DO ESTADO DE SÃO PAULO). A presidência iniciou os ritos definidos pelo Colegiado do Programa e, após exarados os pareceres dos membros do comitê examinador e da respectiva contra argumentação, ocorreu a leitura do parecer final da banca examinadora, que decidiu pela APROVAÇÃO. Este resultado deverá ser homologado pelo Colegiado do programa, mediante o atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca dentro dos prazos regimentais definidos pelo programa. A outorga de título de doutor está condicionada ao atendimento de todos os requisitos e prazos determinados no regimento do Programa de Pós-Graduação. Nada mais havendo a tratar a presidência deu por encerrada a sessão, da qual eu, EDVALDO DA SILVA TRINDADE, lavrei a presente ata, que vai assinada por mim e pelos demais membros da Comissão Examinadora. CURITIBA, 29 de junho de 2020.

EDVALDO DA SILVA TRINDADE
Presidente da Banca examinadora

TÁRCIO TEODORO BRAGA
Avaliador Externo (UFPR)

Proª Drª Alexandra Acco
Pós graduação em Farmacologia UFPR
Nível Mestrado e Doutorado
Matrícula 144894

ALEXANDRA ACCO
Avaliador Externo (UFPR)

MAURO SÉRGIO GONÇALVES PAVÃO
Avaliador Externo (UFRJ)

ROGER CHAMMAS
Avaliador Externo (ICESP)

AGRADECIMENTOS

Muitas pessoas foram fundamentais para mim ao longo desses anos, me ajudando a crescer pessoalmente e profissionalmente. A vocês, sem os quais esse trabalho não teria sido possível, seguem aqui meus sinceros agradecimentos.

A meu pai e minha mãe, por me apoiarem de forma incondicional, nunca hesitando em fazer todo o possível e impossível para que eu pudesse seguir a carreira que escolhi, estando do meu lado nos momentos bons e ruins.

A minha irmã Gláucia, que tanto me incentivou lá atrás a seguir esse caminho, e continua até hoje a acreditar e me incentivar, e ao meu cunhado João Edson, por toda a ajuda e amizade ao longo dos anos.

A minha irmã Janaina, por todo o carinho e preocupação, sempre torcendo pela minha alegria, e ao meu cunhado Anderson, pela ajuda e apoio ao longo do caminho.

Aos meus sobrinhos, Ingrid, Rafael e Isadora, que representam a alegria renovada da nossa casa.

A minha namorada Fernanda, por me aturar nos momentos de frustração dos dias ruins no laboratório, me ajudando a superar problemas, ficando sempre do meu lado e sendo meu porto seguro.

A meu orientador Professor Dr. Edvaldo da Silva Trindade, pela oportunidade, pelos ensinamentos pessoais e profissionais, por ser um exemplo de líder e por me mostrar a importância de olhar para o lado científico sem nunca esquecer o lado humano. Em todas as nossas conversas e reuniões, foi sempre tão nítido ver a preocupação não apenas com um experimento ou o projeto, mas comigo, com a pessoa por trás do cientista.

A Professora Dr^a Carolina Camargo de Oliveira, por tudo que me ensinou, por sempre estar disponível para ajudar e por todas as discussões científicas que tanto me ajudaram a crescer como pesquisador.

A Professora Dr^a Fernanda Simas, por toda a contribuição científica e pessoal, e principalmente por ser pra mim um exemplo de entusiasmo com a pesquisa, a ciência e a universidade.

Ao Professor Edvaldo, a Professora Carolina, a Professora Fernanda e a Professora Célia Regina, por trabalharem e lutarem tanto para a manutenção do grupo de pesquisa LIPS/LCIN da forma como está hoje, proporcionando um

ambiente de trabalho que me foi tão familiar ao longo de todos esses anos e se tornou a minha segunda casa.

A Stelley, por ter me aceitado como aluno de IC há tanto tempo e ter me ensinado tantas coisas ao longo dos anos, tendo um papel fundamental na minha formação como cientista.

Ao Gustavo e a Jenifer, pelas conversas, discussões científicas, risadas, almoços, conselhos, apoio e principalmente pela grande amizade. A convivência com vocês fizeram meus dias mais fáceis e alegres.

Ao João e Odair, pela amizade, pelos momentos de descontração e pelas conversas.

A Aline, pela amizade, por me escutar falando animado sobre algum novo experimento mirabolante e por tanto me ajudar nestes e nos demais ensaios.

Ao pessoal do laboratório que de alguma forma contribuiu para essa tese, seja em experimentos ou nos momentos de convivência (Maira, Anderson, Camila, Yasmin, Victória, Israel, Keila e Jéssica).

Ao Professor Dr. Hugo Alexandre, da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, por ter cedido o polissacarídeo de estudo.

Ao Professor Dr. Roger Chammas, do Instituto do Câncer do Estado de São Paulo, por ter me recebido em seu laboratório e pelas contribuições científicas.

Ao Dr. Robert Gillies, do Moffitt Cancer Center, por ter me recebido em seu laboratório e pelas contribuições científicas.

À Universidade Federal do Paraná, bem como a todos aqueles que lutam diariamente para a manutenção dessa instituição pública de excelência em ensino e pesquisa. Foram 12 anos andando pelos corredores dessa universidade, a qual eu tenho e sempre terei muito orgulho de ter feito parte.

Ao Centro de Tecnologias Avançadas em Fluorescência (CETAF), da UFPR, bem como aos técnicos que ali trabalham.

Aos biotérios do Instituto Carlos Chagas e do setor de Ciências Biológicas da UFPR, bem como aos técnicos que ali trabalham.

Ao Hospital Veterinário da UFPR e ao técnico Olair.

A CAPES, pela bolsa de doutorado e doutorado sanduiche.

Ao CNPq e a CAPES pelo financiamento desse projeto.

RESUMO

Desde 1990, câncer é uma das três maiores causas de mortes da população mundial, com expectativa de diagnóstico de mais de 625 mil novos casos no ano de 2020 no Brasil. O melanoma é o tipo mais agressivo de câncer de pele, e em estágios avançados os tratamentos disponíveis são apenas paliativos, não funcionam para todos os pacientes e geram diversos efeitos colaterais. O uso de compostos de origem natural para o tratamento de diferentes patologias é amplamente descrito na literatura. Um relevante grupo desse tipo de compostos são os polissacarídeos com efeitos medicinais, os quais são amplamente descritos em cogumelos, plantas, animais, bactérias e algas. Entre suas diversas funcionalidades biológicas são descritas atividades antitumorais através de inibição do crescimento tumoral ou da angiogênese, indução de apoptose, aumento de imunocompetência com alterações em subpopulações de células imunológicas e diminuição da progressão metastática. Dentro de nosso grupo de pesquisa, estudos com esse tipo de compostos já apresentaram resultados promissores, tanto em modelos *in vitro* como *in vivo*. Entre esses destaca-se uma homogalactana sulfatada extraída da alga *Codium isthmocladum*, composto aqui denominado de CI. O presente trabalho buscou identificar atividades antitumorais desse polissacarídeo e explorar como estas são induzidas, empregando diferentes modelos de melanoma murino *in vivo* e *in vitro*. CI reduziu a progressão do tumor sólido induzido pela linhagem B16-F10, bem como diminuiu a formação de tumores primários nos pulmões de camundongos submetidos ao modelo de metástase experimental, sem causar efeitos colaterais detectáveis. A atividade antitumoral do polissacarídeo CI foi induzida por modulações das dinâmicas de invasão, glicosilação e adesão das células B16-F10, bem como por imunomodulação, aumentando a quantidade de monócitos/macrófagos no baço dos camundongos, estimulando um perfil pró-inflamatório nestas células caracterizado pela produção de MCP-1 e TNF e aumentando a capacidade de *killing* de células NK. Ao empregar outra linhagem altamente metastática – células de câncer de mama humano MDA-MB-231 – evidenciou-se novamente uma diminuição da progressão metastática *in vivo*, reforçando a característica promissora do composto aqui estudado. Os resultados descritos neste trabalho são relatos inéditos na literatura de uma homogalactana obtida de alga verde com atividade antitumoral em modelos de melanoma murino *in vivo*, aumentando desta forma o conhecimento da atividade de polissacarídeos de fontes naturais e revelando um composto promissor a ser farmacologicamente estudado.

Palavras-chave: Câncer. Melanoma. Polissacarídeo. Metástase. Imunomodulação.

ABSTRACT

Since 1990, cancer has been one of the three biggest causes of death in the world population, with the expectation of more than 625 thousand new cases in 2020 in Brazil. Melanoma is the most aggressive type of skin cancer, and in advanced stages the treatments available are only palliative, not effective for all patients and generate several side effects. The use of compounds of natural origin for the treatment of different pathologies is widely described in the literature. A relevant group of these molecules are polysaccharides with medicinal activities, which are widely described in mushrooms, plants, animals, bacteria and algae. Among its diverse biological functionalities, antitumor activities are described through inhibition of tumor growth, inhibition of angiogenesis, induction of apoptosis, increased immunocompetence with related changes in immune cells subpopulations and decreased metastatic progression. Within our research group, studies with this type of compounds have already shown promising results, both in vitro and in vivo models. Among these stands out a sulfated homogalactan extracted from the algae *Codium isthmocladum*, a compound here denominated CI. The present work sought to identify antitumor activities of this polysaccharide and to explore how these effects are induced, using different in vivo and in vitro melanoma murine models. CI reduced B16-F10 solid tumor progression, as well as decreased the formation of primary tumors in the lungs of mice submitted to the experimental metastasis model, without causing detectable side effects. The antitumor activity of the polysaccharide CI was induced by modulations of invasion, glycosylation and adhesion dynamics of B16-F10 cells, as well as by immunomodulation, increasing the number of monocytes/macrophages in mice's spleen, stimulating a pro-inflammatory profile in these cells characterized by MCP-1 and TNF production and increasing NK cell killing capacity. When using another highly metastatic cell line – MDA-MB-231 human breast cancer - a decrease in metastatic progression in vivo was again observed, another promising activity of CI. The results described here are the first report in the literature of a homogalactan obtained from green algae with antitumor activity in murine melanoma models in vivo, thus increasing the knowledge of polysaccharide activity from natural sources and revealing a promising compound to be pharmacologically studied.

Keywords: Cancer. Melanoma. Polysaccharide. Metastasis. Immunomodulation.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 INCIDÊNCIA DE CÂNCER E IDH: Prevalência dos tipos mais comuns de câncer (excluindo-se o câncer de pele do tipo não melanoma) entre homens e mulheres e sua relação com o IDH dos países onde os mesmos são diagnosticados. FONTE: modificado de Bray <i>et al.</i> , 2018.....	20
FIGURA 2 – PROGRESSÃO DO MELANOMA: Melanócitos normais passam pelo processo de malignização devido a danos causados pela radiação UV, podendo desencadear o processo de desenvolvimento do melanoma. FONTE: modificado de Shain & Bastian, 2016.	24
FIGURA 3 – ABCDE DO MELANOMA: Características que devem ser observadas a fim de identificar pintas possivelmente associadas ao melanoma. FONTE: modificado de < https://www.patientresource.com/Melanoma_FollowUp.aspx >, acessado em 28 de Março de 2020.....	26
FIGURA 4 – MICROAMBIENTE TUMORAL: Células malignizadas recrutam e convertem células normais para um fenótipo pró-tumoral em uma comunicação bidirecional, auxiliando na progressão do tumor e eventualmente alcançando o estágio metastático. FONTE: modificado de Langsten <i>et al.</i> , 2019.	29
FIGURA 5 – PROCESSO METASTÁTICO: Células malignizadas representando o final do processo de seleção evolutiva ocorrido dentro do microambiente tumoral adquirem a capacidade de invadir e colonizar outros tecidos, através do complexo e ineficiente processo conhecido como metástase. FONTE: modificado de Cox <i>et al.</i> , 2018.	32
FIGURA 6 – LINHA TEMPORAL DA METÁSTASE: A partir do intravasamento, células tumorais passam por diversas etapas até o estabelecimento e progressão metastática, a qual pode ser discriminada baseada em sua linha temporal de acontecimentos. FONTE: modificado de Labelle & Hynes, 2012.....	33
FIGURA 7 – TRÊS “ES” DA IMUNOEDIÇÃO: As interações entre células do sistema imune e células transformadas compreendem a vigilância imunológica e as três fases da imunoedição – Eliminação, Equilíbrio e Escape – as quais ocorrem ao longo do desenvolvimento de um tumor, influenciadas pela crescente instabilidade genética característica do microambiente tumoral e a pressão seletiva exercida pelas subpopulações do sistema imune. FONTE: modificado de Bremnes <i>et al.</i> , 2016.....	42
FIGURA 8 – ATIVIDADES JÁ OBSERVADAS DO POLISSACARÍDEO CI: Estudos prévios nas linhagens B16-F10 e RAW 264.7 demonstraram atividades biológicas induzidas pelo composto CI. (A) Captação de Vermelho Neutro. (B) Redução de MTT. (C) Anexina V + 7AAD. (D) Densidade Celular. (E) Ciclo celular. (F) Formação de colônias. (A-F) Linhagem de melanoma murino B16-F10. (G) Produção de ROS. (H) Marcação de CD54. (G-H) Linhagem de macrófagos murinos RAW 264.7.....	60
FIGURA 9 – DETECÇÃO DE LPS: A possível contaminação por LPS foi descartada através da análise e comparação dos picos cromatográficos característicos do lipídeo A (presentes na estrutura do LPS) e do polissacarídeo CI. (A) LPS. (B) CI.	84
FIGURA 10 – ESCOLHA DA DOSE PARA O DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO: A determinação da dose do polissacarídeo para a execução dos ensaios <i>in vivo</i> foi realizada empregando o modelo de tumor sólido e as doses de 50 e 100 mg/Kg. (A) Design experimental. (B) Volume tumoral ao longo do tempo. *p=0.0199 (12º dia, Controle x CI 50 mg/Kg); ****p<0.0001 (13º-15º dias; Controle x CI 50mg/Kg). (C) Volume tumoral final. *p=0.0159. (D) Peso tumoral. *p=0.0159. (E) Peso da glândula adrenal/peso corporal. (F) Peso do fígado/peso corporal. (G) Peso dos pulmões/peso corporal. (H) Peso dos rins/peso	

corporal. Dados resultantes de um experimento biológico, mostrados como Mediana \pm Intervalo interquartil (Controle, N=6; CI, N=5; camundongos machos). (B) Teste de Anova de duas vias com múltiplas comparações. (C-H) Teste de Mann Whitney. 85

FIGURA 11 – CI NÃO MODIFICA A ATIVIDADE ANTITUMORAL DO QUIMIOTERÁPICO DTIC: O efeito do tratamento diário com 50 mg/Kg do polissacarídeo CI e sua combinação com Dtic foram avaliados empregando o modelo de tumor sólido. (A) Design experimental. (B) Volume tumoral ao longo do tempo. **** $p < 0.0001$ (15º dia, Controle x Dtic e Controle x Dtic + CI); *** $p < 0.0008$ (15º dia, Controle x CI 50mg/Kg). (C) Volume tumoral final. ** $p = 0.0095$ (Controle x Dtic); ** $p = 0.0087$ (Controle x Dtic+CI). (D) Peso tumoral. ** $p = 0.0095$ (Controle x Dtic); * $p = 0.0303$ (Controle x Dtic+CI). (E) Variação do peso dos animais. * $p = 0.0173$ (Controle x Dtic); ** $p = 0.0043$ (Controle x Dtic+CI); ** $p = 0.0043$ (Dtic x Dtic+CI); ** $p = 0.0043$ (Dtic x CI) (F) Peso do fígado/peso corporal. (G) Peso do pulmões/peso corporal. (H) Peso dos rins/peso corporal. Dados resultantes de um experimento biológico, mostrados como Mediana \pm Intervalo interquartil (Controle e CI N=6; Dtic, N=4; Dtic + CI, N=4; camundongos machos). (B) Teste de Anova de duas vias com múltiplas comparações. (C-H) Teste de Mann Whitney. 87

FIGURA 12 – CI INDUZ DIMINUIÇÃO DO DESENVOLVIMENTO DO TUMOR SÓLIDO: O efeito do tratamento diário com 50 mg/Kg do polissacarídeo CI foi avaliado empregando o modelo de tumor sólido. (A) Design experimental. (B) Volume tumoral ao longo do tempo. * $p = 0.0141$ (12º dia); **** $p < 0.0001$ (13º-15º dias). (C) Tumores. (a-b) Controle. (c-d) CI 50 mg/Kg. (D) Volume tumoral final. *** $p = 0.0002$. (E) Peso tumoral. ** $p = 0.0071$. (F) Peso do fígado / peso corporal (%) * $p = 0.0145$ (G) Peso do pulmão / peso corporal (%) (H) Peso dos rins / peso corporal (%) (I) Peso do baço / peso corporal (%) * $p = 0.0174$. Dados resultantes de quatro experimentos biologicamente independentes, mostrados como Mediana \pm Intervalo interquartil (Controle, N=26; CI, N=24; camundongos machos). (B) Teste de Anova de duas vias com múltiplas comparações. (D-I) Teste de Mann Whitney. 89

FIGURA 13 – A COLONIZAÇÃO PULMONAR É DIMINUÍDA PELO TRATAMENTO COM CI (21 DIAS): A capacidade do composto CI em diminuir o desenvolvimento de tumores primários induzidos pelo modelo de metástase experimental foi avaliada empregando o modelo de metástase experimental com 21 dias de tratamento diário. (A) Design experimental. (B) Pulmões. (a-d) Controle. (e-h) CI. (C) Área pulmonar colonizada total. *** $p = 0.0002$. (D) Histologia dos pulmões. (a-d) Controle. (e-h) CI. Dados resultantes de um experimento biológico, mostrados como Mediana \pm Intervalo interquartil (Controle, N=12; CI, N=9; camundongos fêmeas). (C) Teste de Mann Whitney. 91

FIGURA 14 – DIMINUIÇÃO DO DESENVOLVIMENTO DE METÁSTASES EM CAMUNDONGOS FÊMEAS: Empregando o sistema de imageamento *in vivo* IVIS foi possível avaliar o efeito do tratamento diário com CI no modelo de metástase experimental em camundongos fêmeas com o uso de células que expressam luciferase, conforme descrito em Material e Métodos. (A) Design experimental. (B) Controle. (C) CI. (D) Bioluminescência dos órgãos *ex vivo*. * $p = 0.0286$ (Baço); * $p = 0.0286$ (Pâncreas). (E) Presença de focos metastáticos no órgão especificado. Dados resultantes de um experimento biológico, mostrados como Mediana \pm Intervalo interquartil (Controle, N=5; CI, N=5; camundongos fêmeas). (D) Teste de Mann Whitney. 93

FIGURA 15 – DIMINUIÇÃO DO DESENVOLVIMENTO DE METÁSTASE EM CAMUNDONGOS MACHOS: Empregando o sistema de imageamento *in vivo* IVIS o efeito do tratamento diário com CI foi avaliado no modelo de metástase experimental em camundongos machos, com o uso de células que expressam luciferase, conforme descrito

em Material e Métodos. (A) Design experimental. (B) Controle. (C) CI. (D) Bioluminescência dos órgãos *ex vivo*. * $p=0.0317$. (E) Presença de focos metastáticos no órgão especificado. Dados resultantes de um experimento biológico, mostrados como Mediana \pm Intervalo interquartil (Controle, N=5; CI, N=5; camundongos machos). (D) Teste de Mann Whitney. . 94

FIGURA 16 – DIMINUIÇÃO DE FOCOS METASTÁTICOS (9 DIAS): A modulação da progressão metastática pelo composto CI foi avaliada após um período reduzido de tratamento, empregando o modelo de metástase experimental. (A) Design experimental. (B) Pulmões. (a-d) Controle. (e-i) CI. (C) Número de focos metastáticos. * $p=0.0317$. Dados resultantes de um experimento biológico, mostrados como Mediana \pm Intervalo interquartil (Controle, N=4; CI, N=5; camundongos fêmeas). (C) Teste de Mann Whitney. 95

Figura 17 – CI REDUZ O DESENVOLVIMENTO TUMORAL EM CÂNCER DE MAMA HUMANO: Empregando células que expressam luciferase e o sistema IVIS, o efeito do tratamento diário com CI foi avaliado no modelo de metástase experimental em câncer de mama humano. (A) Design experimental. (B) Captura de bioluminescência ao longo do tempo. (C) Análise da bioluminescência ao longo do tempo. *** $p=0.0002$ (17º dia); **** $p<0.0001$ (21º dia); * $p=0.0499$ (24º dia); ** $p=0.0019$ (27º dia). (D) Bioluminescência dos pulmões *ex vivo*. (E) Análise da bioluminescência dos pulmões *ex vivo*. *** $p=0.0003$. Dados resultantes de um experimento biológico, mostrados como Mediana \pm Intervalo interquartil (Controle, N=10; CI, N=10; camundongos fêmeas). (C) e (E) Teste de Mann Whitney. 97

FIGURA 18 – ANÁLISE DE INTERFERÊNCIA DO TRATAMENTO COM CI SOBRE A ADESÃO DAS CÉLULAS DE MELANOMA MURINO A DIFERENTES SUBSTRATOS: Possíveis modulações na capacidade de adesão da linhagem B16-F10 em diferentes substratos após o tratamento com 100 $\mu\text{g/mL}$ de CI por 72h ou após o tratamento dos substratos foram avaliadas. (A) Pré-tratamento das células. * $p=0.0286$. (B) Pré-tratamento dos substratos. Dados resultantes de quatro experimentos biologicamente independentes (para Plástico, Matrigel e Colágeno I; 2 experimentos independentes para Fibronectina) com um mínimo de triplicata técnica em cada ensaio, mostrados como Mediana \pm Intervalo interquartil. Teste de Mann Whitney. 104

FIGURA 19 – ANÁLISE DA INTERFERÊNCIA DO TRATAMENTO COM CI SOBRE A DINÂMICA DE INVASÃO CELULAR: Alterações da capacidade invasiva da linhagem B16-F10 após o tratamento com 100 $\mu\text{g/mL}$ de CI por 72h foram avaliadas através da invasão por uma barreira de Matrigel. (A) Áreas representativas das membranas. (a) Controle. (b) CI. Citoplasma representado em verde (FITC); núcleo representado em azul (marcado com DAPI). (B) Análise dos ensaios de invasão celular realizados. Dados resultantes de três experimentos biologicamente independentes com duplicata técnica em cada ensaio, mostrados como Mediana \pm Intervalo interquartil. Teste de Mann Whitney. 105

FIGURA 20 – ANÁLISE DA INTERFERÊNCIA DO TRATAMENTO COM CI SOBRE A QUANTIDADE DE GLICOCONJUGADOS DE MEMBRANA: O efeito do tratamento com 100 $\mu\text{g/mL}$ de CI por 72h sobre a presença de glicoconjugados na membrana plasmática da linhagem B16-F10 foi avaliado utilizando citometria de fluxo. (A) Análise da marcação com WGA. *** $p=0.0007$. (B) Histogramas de Média de Intensidade de Fluorescência. Dados resultantes de três experimentos biologicamente independentes, mostrados como Mediana \pm Intervalo interquartil. Teste de Mann Whitney. 106

FIGURA 21 – IMUNOFENOTIPAGEM DE CÉLULAS OBTIDAS DO BAÇO DE CAMUNDONGOS TRATADOS COM CI: Possíveis modulações em subpopulações de células imunológicas no baço de animais tratados com CI foram avaliadas por citometria de fluxo. (A) CD3+. ** $p=0.0079$. (B) CD3+CD4+. (C) CD3+CD8+. (D) CD3+CD4+CD25+. (E)

CD3+CD8+CD25+. (F) CD11b+. **p=0.0079. (G) CD11b+Ly6C+ * p=0.0159. (H) CD11b+Ly6G+. (I) Peso do baço/peso corporal. *p=0.0159. (J) Estratégia de <i>gate</i> . Dados resultantes de um experimento biológico, mostrados como Mediana ± Intervalo interquartil (Controle, N=5; CI, N=5; camundongos fêmeas). Teste de Mann Whitney.....	107
FIGURA 22 – VIABILIDADE E PROLIFERAÇÃO DA LINHAGEM RAW 264.7: O efeito do tratamento com CI nas concentrações de 1, 10, 100 e 1000 µg/mL por 72h na linhagem RAW 264.7 foi avaliado quanto a sua citotoxicidade e alteração de proliferação. (A) Captação do corante Vermelho Neutro. (B) Redução do MTT. ***p=0.0008. (C) Proliferação celular. Dados resultantes de quatro experimentos biologicamente independentes com triplicata técnica em cada ensaio, mostrados como Mediana ± Intervalo interquartil. Teste de Mann Whitney.	108
FIGURA 23 – ANÁLISE DA FAGOCITOSE CELULAR DE MACRÓFAGOS TRATADOS COM CI: A possível atividade imunomoduladora de aumento da fagocitose celular da linhagem RAW 264.7, frente ao tratamento com 100 µg/mL por 72h de CI foi avaliada. (A) Áreas representativas das lamínulas. Células (a-d) Controle. (e-g) tratadas com CI. (B) Partículas internalizadas / macrófago. ****p< 0.0001. Dados resultantes de dois experimentos biologicamente independentes com duplicata técnica em cada ensaio, mostrados como Mediana ± Intervalo interquartil. Teste de Mann Whitney.	109
FIGURA 24 – ANÁLISE DA INTERFERÊNCIA DE CI SOBRE A PRODUÇÃO DE CITOCINAS <i>IN VITRO</i> : Possíveis alterações no perfil de citocinas produzidas pela linhagem RAW 264.7 após o tratamento com 100 µg/mL por 24 e 72h de CI foram avaliadas. (A) Citocinas pós 24h de tratamento. (B) Citocinas pós 72h de tratamento. Para TNF: **p=0.0015 (Controle x CI); ***p=0.0009 (CI x LPS); *p=0.0169 (CI x CI+LPS); **p=0.0031 (Controle x CI+LPS). Para MCP-1: *p=0.023 (Controle x CI); **p=0.033 (Controle x CI+LPS). Dados resultantes de dois experimentos biologicamente independentes para 24h e três experimentos biologicamente independentes para 72h, mostrados como Mediana ± Intervalo interquartil. Teste de Mann Whitney.	110
FIGURA 25 – ANÁLISE DA INTERFERÊNCIA DE CI SOBRE A PRODUÇÃO DE CITOCINAS <i>IN VIVO</i> : Possíveis alterações no perfil de citocinas obtidas do soro de camundongos tratados por 48h e 96h com CI foram avaliadas (inoculação de células B16-F10 24h após o início do tratamento). (A) Citocinas pós 48h de tratamento. **p=0.0015 (B) Citocinas pós 96h de tratamento. **p=0.0090. Dados resultantes de um experimento biológico mostrados como Mediana ± Intervalo interquartil (para cada ensaio: Controle, N=4; CI, N=4; camundongos fêmeas). Teste de Mann Whitney.	111
FIGURA 26 – ENSAIO DE KILLING: A capacidade do tratamento <i>in vivo</i> com CI de alterar a atividade de <i>killing</i> da linhagem NK foi avaliada empregando células B16-F10 como alvo. (A) Capacidade de <i>killing</i> . *p=0.0230. (B) Controle. (C) CI. (B) e (C) são dot-plots de morte celular representativos do ensaio. Dados resultantes de um experimento biológico mostrados como Mediana ± Intervalo interquartil (Controle, N=3; CI, N=3; camundongos fêmeas). Teste de Mann Whitney.	112
FIGURA 27 – RESUMO DAS PRINCIPAIS ATIVIDADES INDUZIDAS POR CI: Representação das principais atividades induzidas por CI nos modelos <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> , empregando as linhagens B16-F10, RAW 264.7 e MDA-MD-231 e camundongos C57BL/6 e NSG.	132

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Atividades <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> de polissacarídeos em modelos tumorais.	56
Tabela 2: Avaliação de possíveis efeitos colaterais com o tratamento de CI por 96h.....	99
Tabela 3: Avaliação de possíveis efeitos colaterais com o tratamento de CI por 10 dias....	100
Tabela 4: Avaliação de possíveis efeitos colaterais com o tratamento de CI por 22 dias....	101
Tabela 5: Avaliação de possíveis efeitos colaterais com o tratamento de CI por 7 dias em animais não portadores de tumores.....	102
Tabela 6: Avaliação de possíveis efeitos colaterais com o tratamento de CI por 14 dias em animais não portadores de tumores.....	103

LISTA DE ABREVIATURAS

ADAM: Proteínas desintegrinas e metaloproteinases

ADAMTS: Proteínas desintegrinas e metaloproteinases com domínios tipo trombospodina

Apo2L : Ligante de necrose tumoral associado a indução de apoptose

CAF: Fibroblastos associados ao tumor

CCL2: Ligante 2 de quimiocina com motivo C-C

CTLA-4: Antígeno 4 associado ao linfócito T citotóxico

Dtic: Dacarbazina

EGF: Fator de crescimento endotelial

EMT: Transição epitélio-mesenquimal

ERK: Quinases reguladas por sinal extracelular

FDA: *Food and Drug Administration*

GAGs: glicosaminoglicanos

HIF-1: Fator induzível de hipóxia 1

IARC: Agência Internacional para Pesquisa em Câncer

ICAM-1: Molécula de adesão intercelular 1

IDH: Índice de desenvolvimento humano

IFN- γ : *Interferon* γ

IGF-1: Fator de crescimento semelhante a insulina do tipo 1

IL: Interleucina

IL-1: interleucina 1

IL-10: Interleucina 10

IL-13: Interleucina 13

IL-27: Interleucina 27

IL-4: Interleucina 4

IL-6: Interleucina 6

IL-8: Interleucina 8

INCA: Instituto Nacional do Câncer

M1: polarização clássica de macrófagos

M2: polarização alternativa de macrófagos

MAPK: Proteína-quinase ativada por mitógeno

MC1R: Receptor de melanocortina do tipo 1

MCP-1: Proteína 1 quimioatratadora de monócitos

MEC: Matriz extra celular

MHC: Complexo principal de histocompatibilidade

MMP: Metaloproteinase

MMP-14: Metaloproteinase 14

MMP-2: Metaloproteinase 2

MMP-9: Metaloproteinase 9

MTT: Brometo de 3-metil-[4-5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazólio

NF- κ B: fator de transcrição nuclear κ B

NK: célula *Natural killer*

PD-L1: Ligante da proteína programada 1 da morte celular

PI3K: Fosfatidilinositol 3-quinase

ROS: Espécie reativa de oxigênio

TAM: Macrófagos associados ao tumor

TCR: Receptor da célula T

TGF- β : Fator de transformação de crescimento β

Th: Célula T auxiliar

TLR: Receptor do tipo *toll*

TLR-2: Receptor do tipo *toll* 2

TLR-4: Receptor do tipo *toll* 4

TNF- α : Fator de necrose tumoral α

Treg: Célula T regulatória

UV: Radiação ultravioleta

UVA: Radiação ultravioleta tipo A

UVB: radiação ultravioleta tipo B

VEGF: Fator de crescimento vascular endotelial

VEGFA: fator de crescimento do endotélio vascular A

α -MSH: Hormônio alfa estimulante de melanócitos

Sumário

1.	INTRODUÇÃO	16
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.2	Câncer de pele do tipo não melanoma: alta incidência, baixa letalidade	21
2.3	Melanoma: do melanócito à metástase	22
2.4	Biologia do câncer	26
2.4.1	Microambiente tumoral: a subversão da atividade celular	27
2.4.2	Metástase: um intrincado conjunto de processos.....	29
2.5	Câncer e o sistema imune	40
2.5.1	Macrófagos.....	43
2.5.2	Linfócitos T CD4+ e T CD8+.....	44
2.5.3	Células NK.....	46
2.6	Tratamentos contra o câncer e o melanoma	47
2.7	Polissacarídeos de fontes naturais e suas atividades farmacológicas e antitumorais.....	54
3.	OBJETIVOS	61
3.1	Objetivo geral.....	61
3.2	Objetivos específicos.....	61
4.	MATERIAIS E MÉTODOS	62
4.1	Experimentos <i>in vivo</i> – certificados das Comissões de Ética no Uso de Animais (CEUA)	62
4.2	Cultivo celular e animais	63
4.3	Obtenção, caracterização e solubilização do polissacarídeo em estudo	64
4.4	Modelo de tumor sólido – determinação de dose e repetições experimentais.....	66
4.4.1	Determinação de dose	67
4.4.2	Repetição experimental com a dose determinada (50 mg/Kg)	68
4.5	Modelo de metástase experimental	69
4.5.1	Metástase experimental – finalização após 21 dias de inoculação das células (linhagem B16-F10)	70
4.5.2	Metástase experimental – acompanhamento via IVIS (linhagem B16-F10-luc-G5)	71
4.5.3	Metástase experimental – finalização após 9 dias de inoculação das células (linhagem B16-F10).....	72
4.5.4	Metástase experimental – acompanhamento via IVIS (linhagem MDA-MB-231)	73
4.6	Avaliação de efeitos colaterais – parâmetros bioquímicos, hemograma e variação de peso	73
4.7	Cultivo celular – experimentos <i>in vitro</i> com a linhagem B16-F10.....	74
4.8	Adesão celular – linhagem B16-F10	75
4.9	Invasão celular – linhagem B16-F10.....	76

4.10 Marcação de glicoconjugados	77
4.11 Imunofenotipagem do baço – camundongos C57BL/6.....	77
4.12 Cultivo celular – experimentos <i>in vitro</i> com a linhagem RAW 264.7	78
4.13 Viabilidade celular pela redução do MTT – linhagem RAW 264.7	79
4.14 Viabilidade celular pela retenção de Vermelho Neutro – linhagem RAW 264.7	79
4.15 Densidade celular – linhagem RAW 264.7	79
4.16 Fagocitose – linhagem RAW 264.7	80
4.17 Perfil de citocinas – linhagem RAW 264.7.....	81
4.18 Perfil de citocinas – <i>in vivo</i>	81
4.19 Ensaio de <i>killing</i> – células <i>Natural Killer</i>	82
4.20 Análise estatística.....	83
5. Resultados	83
5.1 Detecção de LPS	83
5.2 Avaliação do potencial antitumoral: experimentos <i>in vivo</i> com modelos de melanoma murino	84
5.2.1 Escolha da dose para os estudos.....	84
5.2.2 O tratamento com Dacarbazina associada ao CI não modifica a resposta ao quimioterápico	86
5.2.3 O desenvolvimento de tumor sólido de melanoma é reduzido pelo tratamento com CI ...	88
5.2.4 A formação de tumores primários induzida pelo modelo de metástase experimental de melanoma murino e câncer de mama humano é reduzida pelo tratamento com CI.....	90
5.2.5 O tratamento diário com CI não induz efeitos colaterais detectáveis pelos métodos empregados.....	98
5.3 Modulações de dinâmicas associadas à progressão tumoral	103
5.3.1 A adesão da linhagem B16-F10 é alterada pelo tratamento com CI	103
5.3.2 Tratamento com CI diminui a capacidade invasiva da linhagem B16-F10.....	104
5.3.3 Redução de glicoconjugados após o tratamento com CI	105
5.4 Atividade imunomodulatória	106
5.4.1 CI altera subpopulações do sistema imune presentes no baço	106
5.4.2 O polissacarídeo CI não é citotóxico e não altera a proliferação da linhagem RAW 264.7	108
5.4.3 A capacidade fagocítica é aumentada após o tratamento com CI.....	109
5.4.4 As produções de MPC-1 e TNF são aumentadas após o tratamento com CI.....	110
5.4.5 CI também induz aumento de MCP-1 <i>in vivo</i>	111
5.4.6 A capacidade de <i>killing</i> de células NK obtidas de camundongos tratados com CI é aumentada	112

6. DISCUSSÃO	112
7. CONCLUSÕES.....	132
REFERÊNCIAS.....	133

1. INTRODUÇÃO

Desde 1990 câncer é uma das três maiores causas de mortalidade no mundo, ocasionando mais de 9.6 milhões de óbitos em 2018 (Bray *et al.*, 2018; Wild, Weiderpass e Stewart, 2020). As sombras de uma doença terminal são lançadas quando células malignizadas deixam o tumor primário e são capazes de completar uma série de etapas do processo conhecido como metástase, o qual é responsável por mais de 90% das mortes associadas ao câncer (Lambert, Pattabiraman e Weinberg, 2016).

Células metastáticas surgem a partir de um processo de seleção natural a nível tecidual, o qual resulta no favorecimento de subpopulações com diferentes capacidades celulares, habilitando o processo metastático e originando um grande desafio clínico (Hanahan e Weinberg, 2011; Labelle e Hynes, 2012).

Devido a sua alta capacidade metastática, o melanoma é a forma mais letal de câncer de pele quando diagnosticado de forma tardia, sendo um dos poucos tipos de câncer com taxa de incidência crescente no mundo nas últimas décadas (Ward e Farma, 2017). Apesar de o diagnóstico precoce acompanhado da excisão do tumor primário ser eficiente para a maioria dos pacientes, a disseminação de células metastáticas é altamente comum e rápida (Maverakis *et al.*, 2015).

Os avanços científicos dos últimos anos trouxeram um significativo aumento na sobrevida de pacientes com melanoma metastático, graças ao desenvolvimento de terapias alvo – como os inibidores moleculares do gene *BRAF*, vemufarenib e drabafenib – e imunoterapias – como os inibidores dos pontos de checagem (*immune checkpoints*) anti-CTLA-4 (ipilimumab) e anti-PD1 (nivolumab) (Domingues *et al.*, 2018). Porém, apesar dos progressos, o tratamento de melanoma metastático ainda é um grande desafio. Terapias alvo e imunoterapias são limitadas em sua eficácia devido a grande heterogeneidade genética característica do melanoma e ao desenvolvimento de resistência, beneficiando apenas uma parcela dos pacientes, além de comprometer severamente a qualidade de vida do enfermo, induzindo efeitos colaterais que podem até mesmo representar risco de vida (Kroschinsky *et al.*, 2017; Melis *et al.*, 2017). Desta forma, a busca de novas terapias que superem esses obstáculos é de grande importância.

Um grupo promissor de biomoléculas com atividades antitumorais são polissacarídeos obtidos de fontes naturais. Tais biomoléculas apresentam

citotoxicidade seletiva em células tumorais, interferem com o ciclo celular, diminuem migração e invasão, apresentam capacidade imunomoduladora e reduzem a progressão de tumores sólidos e a disseminação metastática (Khan *et al.*, 2019). Entre as possíveis fontes de obtenção, algas marinhas são umas das origens de polissacarídeos mais relevantes e estudadas, especialmente os sulfatados, como ulvanas, fucanas, fucoidanas e galactanas (Jiao *et al.*, 2011; Manlusoc *et al.*, 2019).

Dentro desse contexto o presente trabalho buscou explorar as possíveis atividades antitumorais de um polissacarídeo extraído da alga verde *Codium isthmocladum*. Este composto foi previamente caracterizado como sendo uma homogalactana altamente sulfatada, composta principalmente de monômeros de β -D-galactopiranosil 3 ligado 4 sulfatado (Farias *et al.*, 2008). Diferentes modelos de melanoma murino *in vivo* foram empregados, assim como experimentos *in vitro*, evidenciando atividades antitumorais promissoras e expandindo o conhecimento das possíveis propriedades farmacológicas de galactanas sulfatadas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Câncer: de uma única célula, três mutações e milhões de mortes

Tão pouco como três mutações condutoras (*driver mutations*, que resultam em ganho de vantagem e aumento do *fitness* de subpopulações malignizadas) em tumores sólidos e até mesmo uma única em tumores hematológicos são o suficiente para, a partir de uma célula inicial, originar linhagens celulares com crescente instabilidade genética e características que fogem da homeostasia (Stratton, Campbell e Futreal, 2009; Tomasetti *et al.*, 2015). Devido a mecanismos de defesa celular e em nível de organismo, como a indução à apoptose e a resposta imunológica, a maior parte dessas células serão eliminadas. Algumas dessas, porém, irão se beneficiar da instabilidade genética, e de tempos em tempos mutações genéticas, epigenéticas e cromossômicas vantajosas serão selecionadas em um cenário de seleção natural a nível tecidual, dando origem a subpopulações que se distanciam cada vez mais do estado de diferenciação celular, gerando uma neoplasia, um tumor, um câncer (Nowell, 1976; Stratton, Campbell e Futreal, 2009).

Desde 1990 o câncer é uma das três maiores causas de mortes no mundo e atualmente corresponde a um conjunto de mais de 200 doenças, que são caracterizadas pela proliferação exacerbada de células a partir de uma progenitora

comum (Fidler, Soerjomataram e Bray, 2016). A linhagem resultante desta célula acumula alterações epigenéticas (como a metilação de DNA, modificação de histonas e remodelamento de cromatina) e um conjunto de danos no DNA, os quais escaparam do sistema de reparo. Devido a essas alterações, oncogenes são ativados e/ou supressores tumorais são silenciados, induzindo a formação de um tumor. Diversos fatores podem contribuir para o surgimento de mutações, como uma dieta rica em gorduras e açúcares, o uso de tabaco, componentes cancerígenos presentes no meio ambiente e exposição à radiação ultravioleta. Esta patologia pode ser denominada benigna quando as células não invadem outros tecidos, sendo possível a remissão completa, na maioria das vezes através da destruição ou extirpação cirúrgica. Será considerada câncer somente se for maligna, onde as células adquirem a capacidade de invadir e colonizar órgãos e tecidos vizinhos e/ou distantes, processo conhecido como metástase, dificultando em muito o tratamento (Maverakis *et al.*, 2015; Sudhakar, 2010; Vaiopoulos, Athanasoula e Papavassiliou, 2014).

Apesar de sua grande relevância como doença contemporânea, os primeiros registros de câncer são antigos. Estudos de fluoroscopia em ossos fossilizados de dinossauros mostram que os animais são acometidos pelo câncer há milhões de anos (Rothschild *et al.*, 2003). As primeiras descrições e comprovações de tumores em humanos datam de 2700 A.C., em múmias do Egito antigo. Nestas descrições, apesar do não uso da terminologia “câncer”, os egípcios distinguiam tumores benignos (não invasivos) de malignos (que se disseminavam pelo corpo), reconhecendo que estes eram incuráveis até mesmo sobre a visão divina. A origem do termo “câncer” é creditado a Hipócrates, que em suas observações médicas associou os tumores ao termo “karkinus”, palavra grega para “carangueijo”, devido à sua forma central e ramificações (Faguet, 2015).

Os números associados a ocorrência de câncer refletem sua expressiva relevância clínica. Segundo o último relatório da Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC), para 2018 eram esperados mais de 18 milhões de novos casos, com 9.6 milhões de óbitos relacionados. Ao longo de suas vidas, um em cada três homens e uma a cada quatro mulheres irão desenvolver câncer. A cada seis mortes reportadas no mundo, uma é relacionada à essa patologia (Bray *et al.*, 2018; Fitzmaurice *et al.*, 2017; Roth *et al.*, 2018; Wild, Weiderpass e Stewart, 2020). No Brasil, o último relatório do Instituto Nacional do Câncer (INCA) estima

que para o triênio 2020-2022 sejam diagnosticados mais de 625 mil novos casos por ano. Em 2017, mais de 218 mil pessoas morreram no país em decorrência do câncer (Schilithz *et al.*, 2020).

A distribuição dos diferentes tipos de cânceres variam enormemente entre as regiões do globo, refletindo diferenças econômicas, culturais e sócio-ambientais, por exemplo: em regiões de baixo índice de desenvolvimento humano (IDH) os casos mais comuns de cânceres são aqueles associados a infecções crônicas (como o de colo de útero), sendo pouco significativo nos locais de maior poder econômico e alto IDH, onde hábitos alimentares e maiores taxas de expectativa de vida têm maior influência nas formas de manifestações da doença; por outro lado, países com alto IDH apresentam uma taxa de incidência da doença, de uma forma geral, de 2 a 3 vezes maior do que países com baixo IDH. O câncer de pulmão apresenta a maior incidência global (11,6% dos casos), seguido do câncer de mama (11,6%) e de próstata (7,1%). A maior taxa de mortalidade também é devida ao câncer de pulmão (18,4%), seguido do câncer de estômago (8,2%) e de fígado (8,2%). De forma semelhante, diferenças de incidência são encontradas em decorrência do sexo, com o câncer de pulmão permanecendo como mais incidente entre homens (13,5%) e o de mama entre as mulheres (24,2%) (Bray *et al.*, 2018). Tais peculiaridades são ilustradas na figura abaixo (Figura 1).

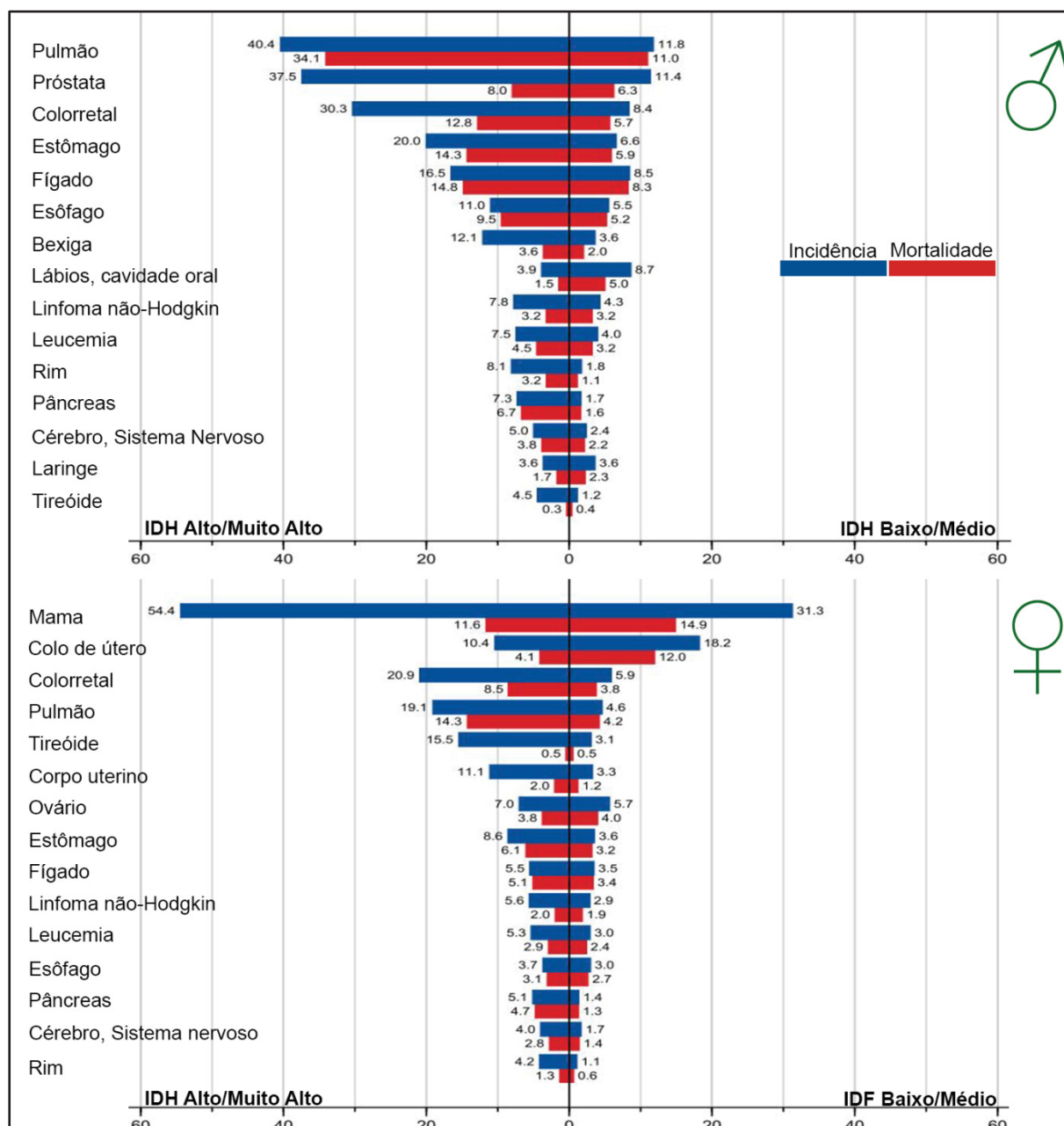


FIGURA 1 INCIDÊNCIA DE CâNCER E IDH: Prevalência dos tipos mais comuns de câncer (excluindo-se o câncer de pele do tipo não melanoma) entre homens e mulheres e sua relação com o IDH dos países onde os mesmos são diagnosticados. FONTE: modificado de Bray *et al.*, 2018.

A incidência de câncer no Brasil segue a tendência mundial de países com IDH alto. Para homens, as estimativas para 2020 apontam que os tipos mais recorrentes da doença serão o câncer de próstata (29,2%), colorretal (9,1%) e trato respiratório (pulmão, traqueia e brônquios; 7,9%). Para mulheres, o câncer de mama prevalecerá com maior incidência (29,7%), seguido do colorretal (9,2%) e de colo de útero (7,4%). Estes valores não levam em conta as estimativas de

incidência do câncer de pele do tipo não melanoma, o qual tende a permanecer como o mais incidente para ambos os sexos na população brasileira (83770 para homens e 93190 para mulheres) (Schilithz *et al.*, 2020).

2.2 Câncer de pele do tipo não melanoma: alta incidência, baixa letalidade

O câncer de pele do tipo não melanoma é a forma mais incidente de câncer em caucasianos, sendo mais comum em pessoas com mais de 40 anos e portadoras de doenças cutâneas prévias. Este tipo de câncer tem início em diferentes linhagens celulares presentes na pele, sendo as formas mais frequentes a de carcinoma basocelular (originado nas células basais localizadas na porção inferior da epiderme) e o carcinoma epidermóide (originado na epiderme). O principal fator de risco para o desenvolvimento do câncer de pele é a exposição prolongada à radiação ultravioleta (UV) (Apalla *et al.*, 2017).

Anualmente são diagnosticados no mundo mais de 1,1 milhão de novos casos de câncer de pele do tipo não melanoma por ano, acreditando-se que este número deva ser subestimado devido a baixa progressão metastática desse tipo de câncer, resultando na falta de registros (Bray *et al.*, 2018). A incidência deste tipo de câncer é uma das poucas que ainda apresenta taxas crescentes, e a mesma deve dobrar nos próximos 30 anos. Em países como Austrália e Estados Unidos, o câncer de pele do tipo não melanoma é o mais incidente, sendo que um em cada cinco americanos irá desenvolver esta patologia ao longo de suas vidas (Apalla *et al.*, 2017; Narayanan, Saladi e Fox, 2010).

No Brasil, estima-se que em 2020 mais de 27% dos tumores malignos detectados em homens e mais de 29% em mulheres serão câncer de pele do tipo não melanoma. Apesar de sua alta incidência, este tipo de câncer apresenta relativa baixa taxa de mortalidade devido a sua baixa capacidade invasiva. Em 2017, 1301 homens e 949 mulheres vieram a óbito em decorrência dessa doença (Schilithz *et al.*, 2020).

O melanoma - outro tipo de câncer de pele e foco do presente trabalho - coloca-se no outro extremo em relação ao previamente exposto, sendo esse associado a uma alta mortalidade.

2.3 Melanoma: do melanócito à metástase

Apesar de sua relativa baixa incidência, representando 1.6% dos casos de câncer diagnosticados no mundo em 2018 (Bray *et al.*, 2018), o melanoma é um câncer com crescente incidência mundial, já sendo o 5º mais frequente em homens e o 6º mais recorrente em mulheres nos Estados Unidos (Noone *et al.*, 2018, disponível em < https://seer.cancer.gov/csr/1975_2015/>. Acesso em 15 de março de 2020). No Brasil, estimam-se que 4200 homens e 4250 mulheres serão diagnosticadas com melanoma em 2020 (Schilithz *et al.*, 2020). Além de sua crescente incidência, o melanoma apresenta uma rápida progressão metastática, representando um grande desafio clínico quando diagnosticado em estágios avançados, sendo a forma mais letal de câncer de pele (Ward e Farma, 2017).

O melanoma é originado de uma população celular específica presente na camada basal da derme: os melanócitos. Estas células têm sua origem na crista neural e colonizam diversos tecidos do corpo durante o desenvolvimento embrionário, constituindo 8% da população celular da epiderme. Na epiderme, estas células formam unidades epidermais ao associarem-se a queratinócitos. Sua maior particularidade é a produção e distribuição de melanina – a qual é sintetizada e armazenada em melanossomos - em resposta ao hormônio alfa estimulante de melanócitos (α -MSH), por sua vez produzido por queratinócitos que sofreram danos ao DNA devido à radiação UV. O hormônio α -MSH liga-se ao receptor de melanocortina do tipo 1 (MC1R), presente na membrana dos melanócitos, desencadeando uma cascata de sinalização que irá induzir a expressão de genes associados a produção de melanina, resistência a morte celular e correção de danos ao DNA. Uma vez produzida e armazenada nos melanossomos, a melanina será enviada e captada por queratinócitos em resposta a alteração do pH extracelular (Cichorek *et al.*, 2013; Maranduca *et al.*, 2019).

A radiação UV é o principal fator ambiental para o desencadeamento do melanoma. Ela é dividida em três espectros de onda: UVA (315 a 400 nm), UVB (280 a 315 nm) e UVC (100 a 280 nm, a qual é filtrada pela camada de ozônio). UVA e UVB são os principais responsáveis pelos danos celulares relacionados ao aparecimento deste tipo de câncer, gerando danos diretos ao DNA, mutações genéticas – normalmente associadas a substituições de Citosina por Timina (C->T) e em menor escala substituições em *tandem* (CC->TT) - e epigenéticas, estresse oxidativo e imunossupressão. Exposições intermitentes e intensas à

radiação UV resultando em queimaduras são associadas com um maior risco de desenvolvimento de melanoma (Chhabra *et al.*, 2017; Ikehata e Ono, 2011).

A população caucasiana apresenta o maior risco de desenvolvimento de melanoma devido à coloração da pele, resultado da taxa dos dois tipos de melanina – eumelanina, mais escura e de maior capacidade fotoprotetora – e feomelanina – mais clara - produzidas pelos melanócitos, sendo que neste grupo populacional há maior produção de feomelanina, resultando em uma cor mais clara da pele e consequente menor proteção à radiação UV (Maranduca *et al.*, 2019).

A progressão do melanoma a partir dos melanócitos apresenta variações normalmente associadas ao grau de dano celular causado pela exposição à radiação UV, podendo seguir uma sequência linear ou apresentar saltos de evolução. Grande parte dos melanomas primários estão relacionados a lesões pre-existentes, como os *nevus*, comumente chamados de pintas. *Nevus* são formados por melanócitos que passam por uma fase de proliferação exacerbada, a qual após um tempo é drasticamente reduzida, podendo permanecer desta forma por muitos anos. O desenvolvimento inicial de *nevus* está associado a uma das mutações condutoras mais comuns presentes no melanoma, a *BRAF* V600E, substituição do aminoácido valina por glutamato no códon 600, o qual é responsável pela síntese da proteína B-Raf, associada principalmente à sinalização celular de proliferação. Novos eventos de dano celular e/ou pré-disposições genéticas podem induzir a progressão para *nevus* displásicos, os quais apresentam uma histologia intermediária entre características benignas e invasivas. A continuação da progressão e o acúmulo de mutações em novos genes condutores pode originar a fase de melanoma *in situ*, caracterizada por altas taxas de proliferação de melanócitos na porção inferior da epiderme, bem como uma histologia tecidual com evidentes características invasivas, a qual também pode permanecer inalterada por vários anos. A fase final de progressão é o surgimento do melanoma metastático apresenta subpopulações celulares altamente invasivas, capazes de avançar através das demais camadas da pele, alcançar a circulação sanguínea e linfática e colonizar novos tecidos (Shain e Bastian, 2016). As etapas de progressão estão ilustradas na figura abaixo (Figura 2).

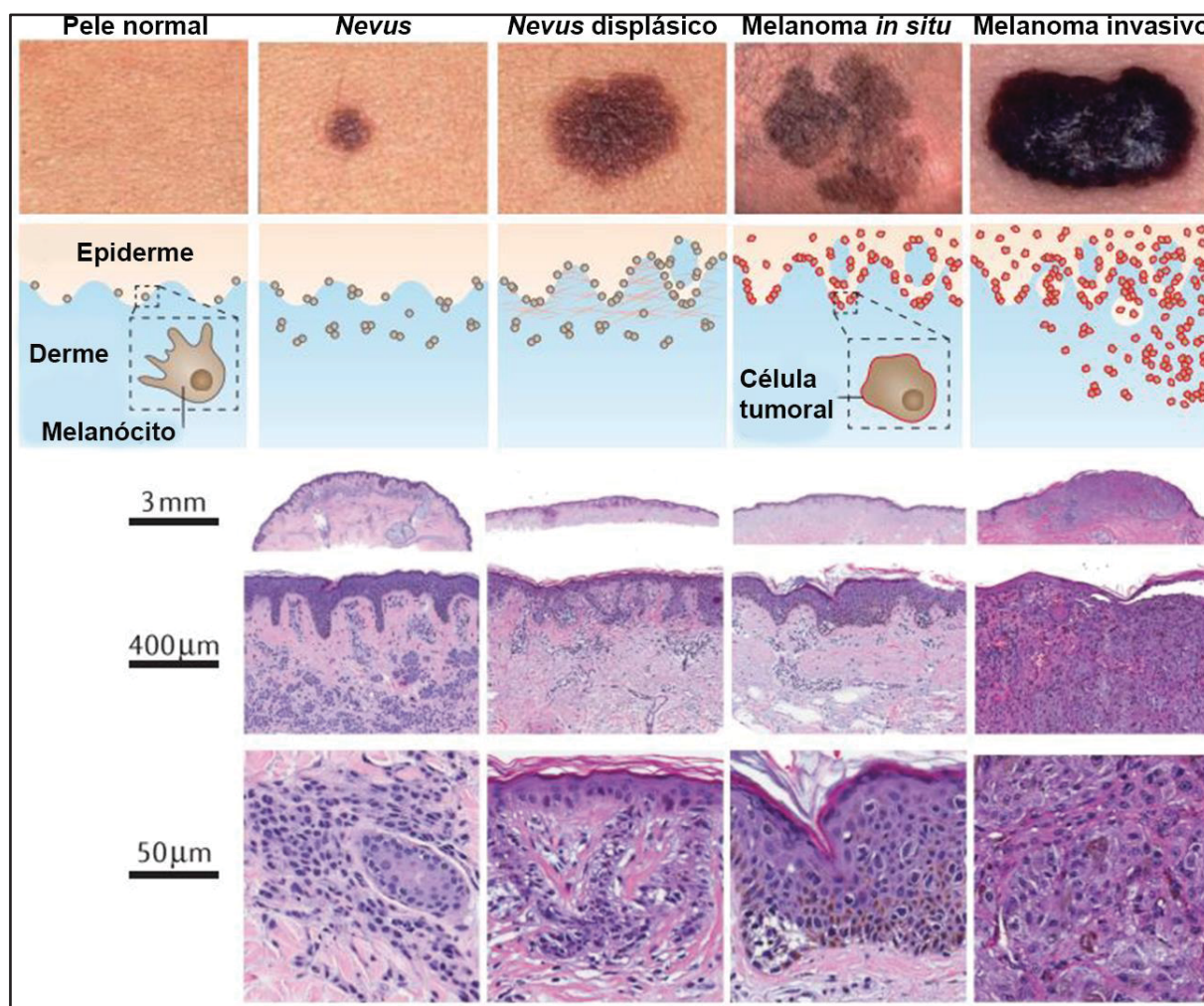


FIGURA 2 – PROGRESSÃO DO MELANOMA: Melanócitos normais passam pelo processo de malignização devido a danos causados pela radiação UV, podendo desencadear o processo de desenvolvimento do melanoma. FONTE: modificado de Shain & Bastian, 2016.

O panorama genético das principais mutações condutoras associadas ao melanoma apresenta quatro grandes grupos: *BRAF*, *RAS*, *NF-1* e triplo negativo (Rabbie *et al.*, 2019).

A ativação constitutiva do gene *BRAF* está presente em aproximadamente 50% dos melanomas metastáticos, e mais de 90% ocorrem devido a mutação V600E previamente citada. A proteína BRAF faz parte da via de sinalização de proteína-quinase ativada por mitógeno (MAPK). A mutação nesse gene torna a via MAPK ativada de forma independente de sinais extracelulares e irresponsiva a sinais inibitórios, induzindo aumento da proliferação e da sobrevivência celular (Ascierto *et al.*, 2012). O gene *NRAS* (da família *HRAS*, *KRAS* e *NRAS*) é o segundo mais comumente mutado em melanoma metastático, estando constitutivamente ativado em 15 a 20% dos pacientes. A proteína RAS é uma GTPase responsável

pela transdução do sinal do início da via MAPK, localizada *upstream* da proteína BRAF. Além de induzir a ativação constitutiva dessa via, a proteína RAS também induz ativação da via fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K), também associada a proliferação e sobrevivência celular (Kunz, 2014). O gene *NF1* codifica a expressão da proteína neurofibromina 1, e é classificado como um supressor tumoral. A proteína neurofibromina 1 regula negativamente a RAS através de interação com a GTPase, convertendo a forma ativa RAS-GTP na forma inativa RAS-GDP. A perda de função desse gene está presente em 12% a 18% de todos os melanomas (Kiuru e Busam, 2017). Melanomas que não apresentam nenhuma dessas mutações são denominados triplo-negativos, e correspondem de 5 a 10% dos casos (Rabbie *et al.*, 2019).

Em 1985 pesquisadores da área médica da Universidade de Medicina de Nova York, buscando desenvolver uma ferramenta simples para que o público em geral e profissionais de saúde pudessem identificar sinais indicativos do desenvolvimento inicial do melanoma, descreveram o chamado ABCD do melanoma, o qual foi posteriormente aprimorado para ABCDE. O significado de cada letra no acrônimo ABCDE é: A para Assimetria – ao desenhar uma linha imaginária cortando o centro da pinta, metades não compatíveis, logo, assimétricas, são características de melanoma; B para Borda – bordas recortadas, que não são suaves, são características de malignidade; C para Coloração – melanomas tendem a apresentar colorações em diferentes tons dentro da mesma pinta; D para Diâmetro – pintas maiores do que a borracha de um lápis, logo, maiores que 6 mm em uma de suas dimensões, são características de melanoma; e E para Evolução – pintas que mudam as características previamente descritas no ABCD ao longo do tempo podem indicar um melanoma (Abbasi *et al.*, 2004; Friedman, Rigel e Kopf, 1985; McCourt, Dolan e Gormley, 2014). Uma representação visual do ABCDE do melanoma esta demonstrada na figura abaixo (Figura 3).

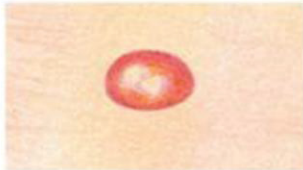






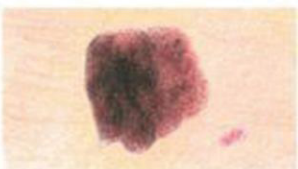


ABCDE	Tumor benigno	Melanoma
A Assimetria	 Simétrico (as duas metades são iguais)	 Assimétrico (uma metade diferente da outra)
B Borda	 Borda regular	 Borda irregular (tem pontas, é desigual e indistinta)
C Coloração	 Uniformemente clara ou escura	 Coloração desigual (tons de marrom, vermelho e preto)
D Dimensão	 Menor do que 6 mm	 Maior do que 6 mm
E Evolução	 Não muda ao longo do tempo	 Muda em tamanho, cor, borda e simetria

FIGURA 3 – ABCDE DO MELANOMA: Características que devem ser observadas a fim de identificar pintas possivelmente associadas ao melanoma. FONTE: modificado de < https://www.patientresource.com/Melanoma_FollowUp.aspx >, acessado em 28 de Março de 2020.

2.4 Biologia do câncer

A progressão tumoral depende da aquisição e seleção de características vantajosas que vão possibilitar e sustentar o desenvolvimento do tumor primário e do processo metastático. Hanahan e Weinberg agruparam tais características nos

chamados “*Hallmarks of cancer*”, sendo esta classificação até hoje de extrema relevância. Tais características são: a proliferação sustentada – aumentando a expressão de receptores de fatores de proliferação, bem como de moléculas presentes *downstream* dessas cascatas de sinalização; evasão de supressores de crescimento – resultado de mutações condutoras que suprimem genes associados ao arrasto do ciclo celular, como a proteína p53; resistência à morte celular – alterando a expressão e funcionamento de receptores de estresse celular e moléculas efetoras da cascata apoptótica; evasão da senescência celular (imortalização) – adquirindo uma deficiência transiente da atividade da telomerase; indução da angiogênese – resultado da alta produção de fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) sustentando pelas células tumorais e por outras células associadas ao microambiente tumoral; capacidade invasiva e metastática – através da modificação do perfil de receptores celulares habilitando a migração e invasão, bem como pelo remodelamento da matriz extracelular (MEC); e recentemente incorporado a esse conjunto de mecanismos celulares, a reprogramação do metabolismo energético celular – possibilitando a sobrevivência celular no ambiente intratumoral altamente hipóxico - e evasão da destruição pelo sistema imune – fundamental para o início, desenvolvimento e realização do processo metastático (Hanahan e Weinberg, 2000, 2011).

Permeado por essas características adquiridas, alguns mecanismos e peculiaridades do câncer destacam-se: o microambiente tumoral, a capacidade metastática e a interação entre sistema imune e câncer.

2.4.1 Microambiente tumoral: a subversão da atividade celular

Tumores primários e focos metastáticos não são apenas constituídos de células transformadas. Células não malignizadas associadas aos tumores correspondem a até mais da metade da população tumoral. Subpopulações do sistema imune, como linfócitos, neutrófilos, macrófagos, e células dendríticas, bem como pericitos, adipócitos e fibroblastos fazem parte do heterogêneo microambiente tumoral e têm seus mecanismos celulares desvirtuados para promoção do desenvolvimento do tumor em diferentes etapas do mesmo. Os fibroblastos associados ao tumor (CAF, do inglês *cancer associated fibroblasts*), por exemplo, secretam diferentes fatores de crescimento e proliferação, como o fator de

crescimento endotelial (EGF, *endotelial growth factor*) e o fator de crescimento semelhante a insulina do tipo 1 (IGF-1, *insulin growth fator 1*). Os CAFs também estão associados à liberação de fator de transformação de crescimento β (TGF- β , *transformation growth fator β*) o qual promove um perfil mesenquimal e invasivo das células malignizadas, sendo ainda induzidos a produzirem enzimas proteolíticas, auxiliando assim no remodelamento da MEC e no processo de invasão celular (Balkwill, Capasso e Hagemann, 2012).

A comunicação entre células malignizadas e células não transformadas no microambiente tumoral é bidirecional e molda o fenótipo destas. Células tumorais produzem e liberam fatores que recrutam CAFs, como o TGF- β , bem como expressam um perfil de citocinas (proteínas solúveis que participam da comunicação celular) pró-inflamatório, recrutando células do sistema imune. Apesar do infiltrado tumoral de células do sistema imune poder resultar em resposta imunológica contra o tumor, o que se observa é majoritariamente o contrário: através de mecanismos imunossupressores, como a hipóxia e a consequente expressão do fator induzível de hipóxia 1 (HIF-1), linfócitos T CD8⁺ citotóxicos e células *Natural Killer* (NK) perdem a atividade antitumoral; via interleucinas, como a IL-4 e a IL-13, macrófagos infiltrados no tumor são polarizados para o fenótipo M2, passando a ser denominados macrófagos associados ao tumor (TAMs, *tumor associated macrophages*) e a ter atividades pró-tumorais (Najafi, Goradel, *et al.*, 2019; Whiteside, 2008).

A formação do microambiente tumoral será de extrema importância para sustentar todas as etapas de progressão tumoral, habilitando por fim o processo metastático. Para alcançar e colonizar outros tecidos, bem como estimular o crescimento do tumor primário, a angiogênese e a linfangiogênese são estimuladas no microambiente tumoral. Além de suas propriedades imunossupressoras, o aumento da expressão de HIF-1 no microambiente tumoral induz a produção de VEGF por CAFs e TAMs, promovendo uma neovascularização tecidual e uma porta de acesso para o sistema circulatório (Langsten *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2017). Um modelo ilustrando o microambiente tumoral e a progressão do mesmo é demonstrado na figura abaixo (Figura 4).

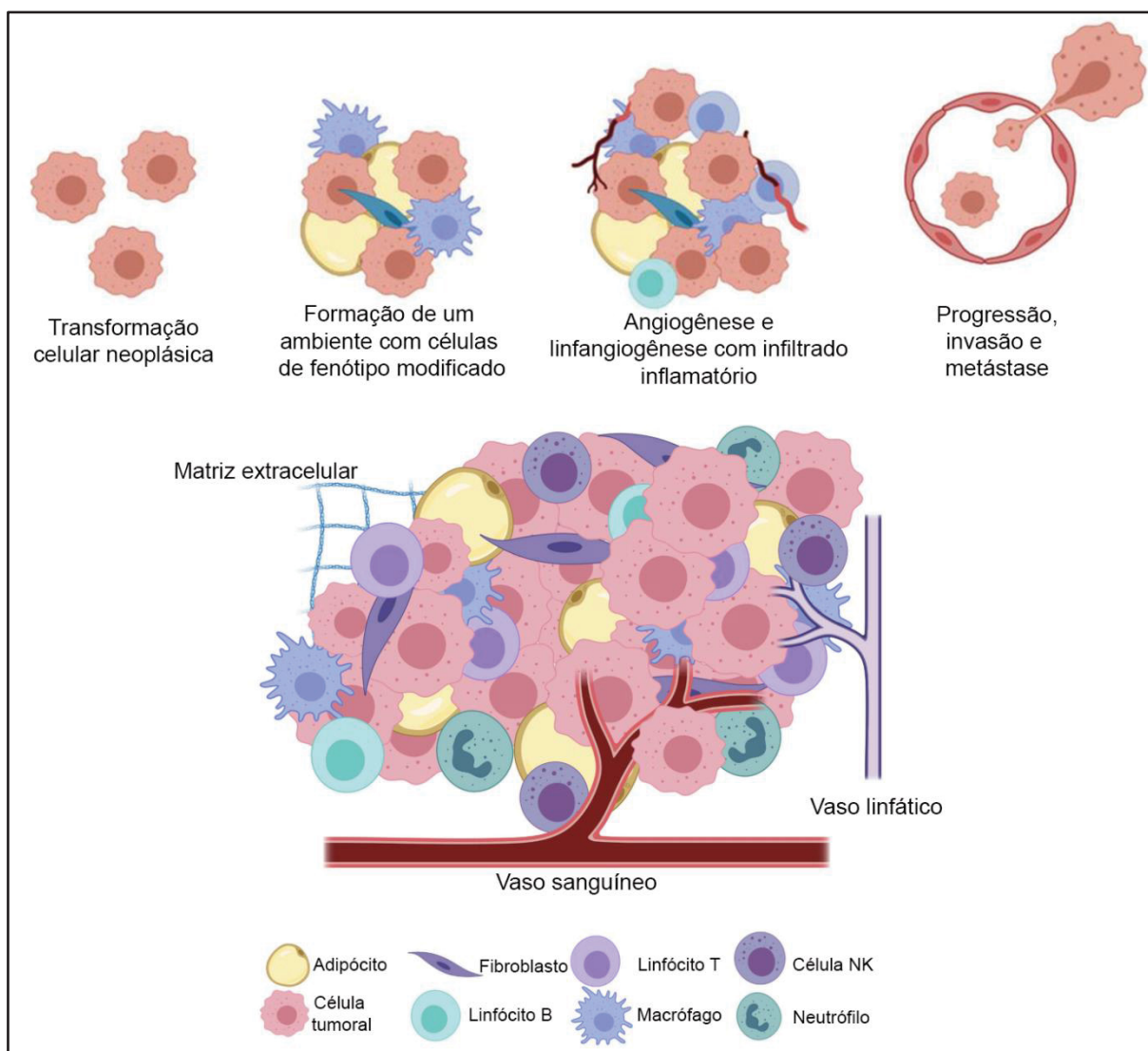


FIGURA 4 – MICROAMBIENTE TUMORAL: Células malignizadas recrutam e convertem células normais para um fenótipo pró-tumoral em uma comunicação bidirecional, auxiliando na progressão do tumor e eventualmente alcançando o estágio metastático. FONTE: modificado de Langsten *et al.*, 2019.

2.4.2 Metástase: um intrincado conjunto de processos

A cada dez mortes associadas ao câncer, nove são em decorrência da metástase – um conjunto de passos realizados por células malignizadas que deixam o tumor primário e obtêm sucesso em colonizar novos tecidos e órgãos (Lambert, Pattabiraman e Weinberg, 2016).

Apesar de sua importância clínica, o processo de metástase é complexo e pouco eficiente, tendo em vista que é necessário cumprir uma série de etapas biológicas, e ao final destas, poucas células que deixaram o tumor primário serão transportadas pela corrente sanguínea e conseguirão invadir e colonizar outros tecidos e órgãos. O novo local de crescimento tumoral é determinado por fatores

mecânicos (como semelhança no padrão circulatório entre a região do tumor primário e a região do foco metastático) e similaridades moleculares, como descrito na hipótese do “*soil and seed*”. As células que deixam a neoplasia inicial são heterogêneas e representam subpopulações selecionadas no final do processo de evolução tumoral, sendo este um dos motivos da resistência a tratamentos em estágios metastáticos do câncer (Chambers, Groom e MacDonald, 2002; Fidler, Soerjomataram e Bray, 2016; Steeg, 2016).

O primeiro passo do processo metastático envolve a transposição da barreira biológica representada pela membrana basal, uma porção especializada da MEC. Em nível celular, nesta etapa a invasão ocorre de forma coletiva (unidades multicelulares movendo-se de forma unificada) ou individual, sendo que essas estratégias podem alternar entre si, e envolvem proteases, como metaloproteinases (MMPs), alterações conformacionais do citoesqueleto e interações entre receptores de superfície e a MEC. O passo seguinte é a intravasão – entrada dessas células tumorais em vasos sanguíneos e linfáticos. A neoangiogênese induzida pelo microambiente tumoral abre uma das portas para essa etapa: os novos vasos formados no interior do tumor carecem de estruturação completa, sendo facilmente acessados por células metastáticas. O estado inflamatório e o estresse oxidativo gerado pelo microambiente tumoral também auxilia a intravasão: em decorrência destes estados, o fator de transcrição nuclear $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$) é ativado, aumentando a expressão de moléculas de adesão nas células endoteliais, como a molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1) e E-selectinas, bem como diminuindo a integridade do endotélio, facilitando assim a interação com as células tumorais e a passagem das mesmas. Ao entrarem na circulação, as células malignizadas precisam transpor fatores de estresse físico – característicos da biofísica hemodinâmica; biológicos – como a ausência de ancoragem e sinais de sobrevivência; e as defesas do corpo, representados pelas células do sistema imune. A partir da circulação, células malignizadas têm de se fixar no endotélio de tecidos e órgãos distantes. Como previamente citado, umas das hipóteses para o sucesso desta etapa são as características físicas e biológicas do tecido alvo, o que faz com que haja um direcionamento da metástase para ambientes mais propensos (hipótese do *seed and soil*). Outra possibilidade diz respeito a rede de capilares característica de cada tecido: células metastáticas ficam presas nessas redes devido a seu diâmetro, o que possibilita a progressão do processo metastático; ainda nesse sentido, alguns

órgãos estariam mais propensos à metástase devido a seu grande aporte sanguíneo, como o fígado através da veia porta hepática. Uma vez alojado no endotélio, as células metastáticas precisam novamente transpor essa barreira, processo agora denominado de extravasão. Este é mecanisticamente diferente da intravasão, uma vez que no tecido alvo o estado inflamatório e oxidativo, característico do tumor primário, não está presente – ou está de forma significativamente reduzida – bem como a falta de estruturação endotelial, característica do microambiente tumoral, não ocorre nesse novo tecido. Algumas moléculas secretadas pela célula malignizada parecem auxiliar nesta etapa, como a proteína 4 semelhante a angiopoietina, aumentando a permeabilidade da barreira endotelial. Após a invasão no tecido alvo, as células tumorais precisam sobreviver dentro do novo ambiente, formando micrometastases. Uma das hipóteses que possibilita essa sobrevivência consiste na existência de um nicho pré-metastático, formado via produção de exossomos do tumor primário, os quais afetam as células e a MEC de outros tecidos, promovendo assim um ambiente passível de colonização. Por fim, células malignizadas no novo tecido precisam desencadear mecanismos celulares que vão permitir a colonização tumoral, com altas taxas proliferativas e, novamente, uma neoangiogenese. Tal processo pode demorar semanas, meses ou anos, uma vez que essas micrometástases podem adquirir um perfil de dormência e só retomarem a atividade em condições biológicas mais favoráveis, sendo este um dos motivos da recorrência do câncer anos após a eliminação do tumor primário (Liou e Storz, 2010; Mittal, M. *et al.*, 2014; Pachmayr, Treese e Stein, 2017; Valastyan e Weinberg, 2011). A figura abaixo (Figura 5) ilustra as diferentes etapas e interações que ocorrem ao longo do processo metastático. Os passos aqui citados estão destacados dentro de retângulos.

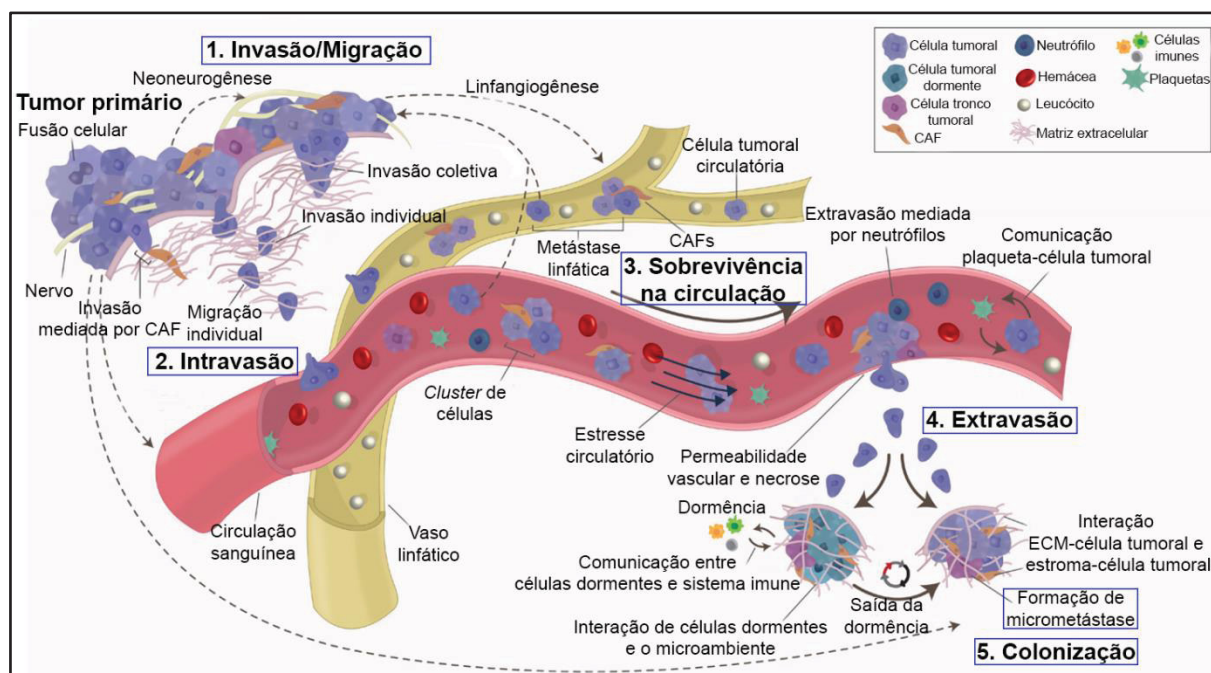


FIGURA 5 – PROCESSO METASTÁTICO: Células malignizadas representando o final do processo de seleção evolutiva ocorrido dentro do microambiente tumoral adquirem a capacidade de invadir e colonizar outros tecidos, através do complexo e ineficiente processo conhecido como metástase. FONTE: modificado de Cox *et al.*, 2018.

Empregando dados obtidos de modelos de metástase experimental foi possível traçar a linha temporal do processo metastático a partir do momento em que as células malignizadas entram na corrente sanguínea, como descrito por Labelle & Hynes, 2012 (Labelle e Hynes, 2012):

- transito pela circulação sanguínea: devido a seu grande diâmetro, células tumorais passam poucos minutos na circulação, sendo rapidamente presas em redes de capilares nos tecidos e órgãos;

- adesão inicial e fixação: após ficarem presas na rede de capilares, células malignizadas podem iniciar interações com microambiente e o endotélio a fim de promover sua fixação, etapa que pode durar de minutos a horas; durante o transporte e o período de adesão/fixação, células do sistema imune como as NK, bem como o estresse físico intrínseco ao ambiente circulatório podem eliminar as células malignizadas; como forma de proteção, células metastáticas promovem a interação com plaquetas através de ligantes de P-selectina, formando trombos, que funcionam como uma barreira física de proteção; fatores solúveis, como citocinas, liberados por células malignizadas aderidas ao endotélio promovem sua ativação,

aumentando a expressão de proteínas de adesão como E-caderina e P-selectina, e a interação célula tumoral-endotélio;

- extravasão e colonização inicial: a entrada das células tumorais no tecido alvo e o início da colonização tecidual normalmente ocorrem nos primeiros três dias; o sucesso nesta etapa depende das capacidades invasivas das células malignizadas, as quais liberam no microambiente metaloproteinases para causar a ruptura da integridade endotelial; mais uma vez a interação entre células tumorais e plaquetas auxilia no processo invasivo, visto que plaquetas associadas a células metastáticas apresentam um perfil de expressão gênica de citocinas e de metaloproteinases que auxiliam a invasão tecidual; macrófagos com fenótipo pró-tumoral são recrutados ao sítio metastático, e sua interação com as células malignizadas promove liberação de fatores angiogênicos, como o VEGF, e antiapoptóticos, auxiliando os momentos iniciais de colonização tecidual; neste mesmo sentido, o sucesso na colonização inicial e o posterior desenvolvimento do foco metastático dependerá da interação entre as células malignizadas e os fibroblastos e sua conversão em um perfil de expressão gênica de CAFs pró-tumorais. A linha temporal metastática é apresentada na figura abaixo (Figura 6).

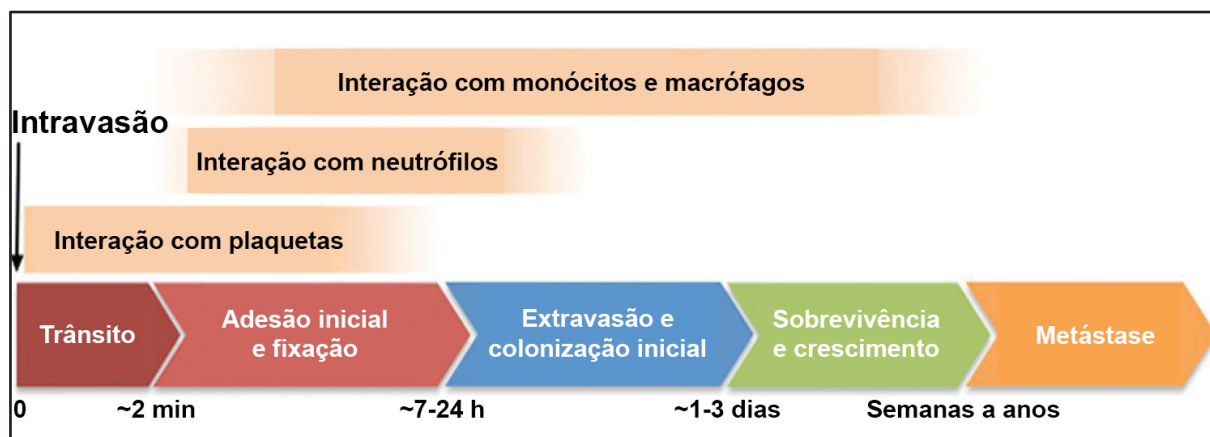


FIGURA 6 – LINHA TEMPORAL DA METÁSTASE: A partir do intravasamento, células tumorais passam por diversas etapas até o estabelecimento e progressão metastática, a qual pode ser discriminada baseada em sua linha temporal de acontecimentos. FONTE: modificado de Labelle & Hynes, 2012.

A capacidade invasiva adquirida por linhagens malignizadas é de grande importância no melanoma, conhecido como uma forma de câncer altamente metastática. Essa definição deve-se a certas características das células de melanoma, as quais contribuem para o início do processo metastático e manutenção do mesmo: possuem diversos receptores de membrana compartilhados com células

do endotélio, permitindo suportar as forças mecânicas características da circulação, aderir e extravasar para tecidos adjacentes; possuem uma alta expressão de citocinas pró-inflamatórias e pró-angiogênicas, como interleucina 8 (IL-8) e fator de crescimento do endotélio vascular A (VEGFA); alta produção de exossomos e microvesículas a partir do tumor primário, permitindo a modificação e formação de um microambiente tumoral favorável nos locais de metástase; características mesenquimais, como baixa expressão de E-caderina e elevada expressão de N-caderina, promovendo mobilidade celular; e alta capacidade de evasão do sistema imune, promovendo o bloqueio de receptores de células T, alterações nas subpopulações de linfócitos (menos células T citotóxicas, mais células T reguladoras) e imunossupressão generalizada (Braeuer *et al.*, 2014). Essas e outras características são adquiridas através de diversas mutações, resultado de um dos tipos de câncer com uma das maiores taxas de mutação por milhão de pares de base e um extenso processo de alterações epigenéticas (Moran *et al.*, 2017).

Como previamente descrito, a progressão metastática é acompanhada da modificação, entre outros, de receptores de adesão celular, da atividade e produção de metaloproteinases, do padrão de glicosilação celular e da ativação, em cânceres de origem epitelial, da transição epitélio-mesenquimal, fenômenos os quais merecem maior detalhamento.

2.4.2.1 Receptores de adesão celular e metástase

As interações célula-célula e célula-matriz extracelular governam diferentes mecanismos envolvidos em situações homeostáticas e patológicas. As interações célula-célula são mediadas por junções aderentes – estruturas celulares especializadas constituídas de caderinas (como E e N-caderina) e complexos proteicos, os quais fazem a conexão com o citoesqueleto de actina. A estrutura conformacional das junções aderentes e a correta distribuição espacial das caderinas – a qual será influenciada pelo tipo de caderina presente – apresentam papéis fundamentais na homeostasia, como ao longo do desenvolvimento embrionário - participando da correta polarização celular e da manutenção da integridade tecidual – e na manutenção da integridade e permeabilidade endotelial. No câncer, as interações célula-célula via caderinas são altamente reguladas. A disrupção dessas interações no tumor primário permite o início da cascata

metastática, enquanto que a manutenção das interações via E-caderina entre células malignizadas em migração auxilia no processo de invasão coletiva (Gloushankova, Rubtsova e Zhitnyak, 2017).

Integrinas são uma grande família de receptores de superfície celular que governam interações célula-matriz extracelular, constituídas de uma subunidade α e uma β , e em resposta a esta interação auxiliam na sinalização de eventos como adesão, migração, crescimento, proliferação e morte celular. Em homeostasia, integrinas participam de diferentes processos, como a manutenção da pluripotência celular de células tronco, fornecendo pontos de interação com a MEC e garantindo assim a divisão celular assimétrica; a interação entre integrinas e a MEC também é responsável pela sobrevivência das células, sendo que em sua ausência o processo de apoptose induzido pela falta de ancoragem ("anoikis") é desencadeado. Dado sua importância na sinalização celular de diferentes mecanismos, a modulação de integrinas no câncer resulta em atividades pró-tumorais. Maiores expressões de integrina $\beta 1$ e $\beta 4$, por exemplo, são associadas a etapas iniciais da formação tumoral, a proliferação de células no tumor primário e a diferentes etapas do processo metastático, desde seu início até mecanismos de dormência celular (Anderson, Owens e Naylor, 2014; Hamidi e Ivaska, 2018).

No melanoma, a diminuição da expressão de E-caderina leva, por exemplo, a uma redução da adesão entre melanócitos e queratinócitos, o que está associado, nos estágios iniciais do desenvolvimento tumoral, a um perfil celular proliferativo e de maior motilidade. Quanto às integrinas, sabe-se que a expressão e predominância de diferentes conjuntos de subunidades varia ao longo da progressão do tumor. Além de estar relacionado à adesão e maior motilidade dos melanócitos malignizados, algumas integrinas, como a integrina $\alpha_5\beta_3$ auxiliam o remodelamento da MEC através da localização de metaloproteinases na superfície celular (Janiszewska, Primi e Izard, 2020; McGary, Chelouche Lev e Bar-Eli, 2002).

2.4.2.2 Metaloproteinases e a progressão tumoral

Metaloproteinases de matriz extracelular (MMPs) compõem um conjunto de mais de 23 endopeptidases secretadas e de membrana que clivam componentes da MEC e moléculas de adesão. Elas fazem parte de uma família de proteinases também composta por Proteínas Desintegrinas e Metaloproteinases (ADAMs) e

Proteínas Desintegrinas e Metaloproteinases com Domínios tipo Trombospodina (ADAMTS). São sintetizadas como zimogênios inativos (pró-MMP) e ativadas, normalmente fora das células, por outras MMPs ou outras proteinases. A clivagem da MEC por MMPs revela neoepítopos e fragmentos peptídicos que se ligam a receptores celulares e desencadeiam a ativação de vias de sinalização, resultando em diferentes mecanismos, como a indução a proliferação, migração e angiogênese. Moléculas de adesão celular, como caderinas e integrinas, também podem ser clivadas por MMPs, aumentando a motilidade celular. Na maioria dos tipos de câncer a expressão de MMPs é aumentada (Mott e Werb, 2004; Quintero-Fabián *et al.*, 2019).

O microambiente tumoral é altamente influenciado pela atividade das MMPs, resultando em diferentes respostas pró-tumorais em todos os estágios da progressão: nos estágios iniciais de desenvolvimento tumoral, MMPs causam disrupção das interações entre as células malignizadas com moléculas da MEC presentes na membrana basal, reduzindo dessa forma sinais de interação celular que limitam a diferenciação e a proliferação; ainda neste estágio, células transformadas liberam citocinas e quimiocinas atratoras, recrutando fibroblastos e células do sistema imune, como macrófagos e neutrófilos, os quais iram depositar na MEC sinais de crescimento celular, os quais serão posteriormente liberados no microambiente tumoral pelo remodelamento da MEC induzido pelas MMPs; em alguns tipos de câncer, ADAMs clivam a MEC liberando formas solúveis de EGF e neoepítopos para seu receptor (EGFR), e a ativação dessa via de sinalização induz um aumento da expressão de MMP-9, a qual cliva E-caderina promovendo proliferação celular; as MMP-2, 9 e 14 são altamente relevantes na promoção do crescimento tumoral devido a sua participação na angiogênese, a qual tem maior atividade na margem invasiva dos tumores e ocorre em resposta a biodisponibilidade de VEGF e neoepítopos semelhantes liberados pela degradação da matriz extracelular; no processo invasivo, a interação entre integrinas e diferentes componentes da MEC, como colágeno I, induz a maior produção de MMPs e sua colocalização por receptores, como o CD44, nos invadopódios das células em migração individual e na região apical das células em invasão coletiva (Gonzalez-Avila *et al.*, 2019; Kessenbrock, Plaks e Werb, 2010).

2.4.2.3 Glicoconjugados e sua relação com o processo metastático

A glicosilação (inserção *co* e pós-traducional de oligossacarídeos) em proteínas e lipídeos gera glicoproteínas e glicolipídeos que fazem parte da superfície celular, compondo o glicocálix (Reitsma *et al.*, 2007). Os proteoglicanos são proteínas altamente glicosiladas, resultados da adição de uma ou mais cadeias não ramificadas de glicosaminoglicanos (GAGs), processo que ocorre no lúmen do aparelho de Golgi através de diversas etapas enzimáticas (Prydz e Dalen, 2000). O padrão de glicosilação protéica e lipídica nos glicoconjugados de membrana, bem como suas interações com as proteínas e proteoglicanos que compõem a MEC influenciam diretamente os processos de reconhecimento e sinalização celular em situações de homeostasia e patologias. A glicosilação pode ser do tipo *N*-glicosilação (quando oligossacarídeos são inseridos no grupo amina de resíduos de asparagina), *O*-glicosilada (quando os carboidratos são inseridos na hidroxila de resíduos de serina ou treonina), *C*-glicosilação (quando um resíduo de manose é inserido a um dos carbonos de triptofano) e a inserção de glicídeos em âncora de GPI (como o glicosilfosfatidilinositol) (Moremen, Tiemeyer e Nairn, 2012; Ohtsubo e Marth, 2006).

Entre os glicoconjugados de interesse no câncer, destacam-se os proteoglicanos. A maioria destes são extracelulares, sendo componentes estruturais e de interação com fatores de crescimento, citocinas, quimiocinas e entre células. Associados aos proteoglicanos e sendo muitas vezes mais relevantes biologicamente do que o próprio *core* proteico a que estão associados, estão os glicosaminoglicanos que os constituem (GAGs). GAGs são heteropolissacarídeos lineares e carregados negativamente devido à presença de grupamentos sulfato e/ou carboxilato em suas estruturas. São constituídos de unidades repetitivas de dissacarídeos compostos por uma hexosamina (glucosamina ou galactosamina) e um ácido urônico ou um açúcar neutro. Devido às suas peculiaridades estruturais, como tipo de unidade dissacarídica e padrão de sulfatação, os GAGs, presentes nos proteoglicanos, são agrupados em heparinas, queratam sulfato, heparam sulfato, condroitim sulfato e dermatam sulfato. Outro GAG de relevância no câncer é o ácido hialurônico, o qual diferentemente dos demais não é sulfatado e não está ancorado a um *core* proteico (portanto, não forma proteoglicano), sendo secretado e acumulado na MEC (Pomin e Mulloy, 2018).

A progressão tumoral é acompanhada de alterações do padrão de glicosilação, resultando em modificações de quantidade, ramificação, diversidade e estrutura de glicoconjugados. Tais alterações apresentam implicações relacionadas a vários dos previamente citados *hallmarks* do câncer: a proliferação sustentada das células tumorais pode ser modulada por proteoglicanos produzidos por CAFs, como o sindecam 1, capaz de capturar fatores de crescimento através das cadeias de heparam sulfato, promovendo disponibilidade desses fatores no microambiente tumoral e consequente ativação de receptores de fatores de crescimento (como o EGFR), bem como por um aumento da via de sinalização do EGFR devido a sua maior fucosilação – adição de fucose ao proteoglicano – resultando em maior sensibilidade e avidéz do receptor a seu ligante EGF; a resistência a morte celular pode ser auxiliada por padrões de glicosilação que diminuem a responsividade de receptores a seus ligantes, como por exemplo modificações de O-glicosilação nos receptores TRAIL-R1 E TRAIL-R2, tornando-os menos sensíveis a ligação ao ligante de necrose tumoral associado a indução de apoptose (Apo2L); na evasão a supressores de crescimento, alterações no padrão de O-glicosilação das proteínas p53 e retinoblastoma alteram suas dinâmicas de fosforilação, levando a sua degradação e ativação constitutiva, respectivamente, desencadeando a progressão do ciclo celular; no processo de invasão, a sialilação - inserção de um ácido siálico no proteoglicano, comumente detectada em vários tipos de câncer devido ao aumento da expressão da sialiltransferase – induz, entre outros efeitos, uma diminuição da adesão célula-célula e célula-matriz extracelular através de repulsão eletrostática devido as cargas negativas, favorecendo dessa forma um fenótipo mais migratório e invasivo; a evasão do sistema imune também está associada a padrões alterados de glicosilação, como a fucosilação, que aumenta a interação de células tumorais com macrófagos e células dendríticas via receptores de lectina tipo C. Tal característica leva à produção de IL-10 e IL-27 que irão favorecer a atividade de células T auxiliares do tipo 2, a qual é imunossupressora; ainda quanto a modulação do sistema imune, uma maior sialilação em células de melanoma diminui a capacidade de reconhecimento e eliminação das células tumorais por células T citotóxicas e células NK (Peixoto *et al.*, 2019; Pinho e Reis, 2015).

2.4.2.4 A Transição Epitélio-Mesenquimal

A Transição Epitélio-Mesenquimal (EMT) é um conjunto de processos originalmente presentes no desenvolvimento embrionário e no reparo tecidual, sendo reativado por células malignizadas na progressão de cânceres de origem epitelial, como o melanoma, promovendo a aquisição de uma atividade mais migratória e invasiva. Tal aquisição ocorre através de alterações na expressão gênica que resultam na perda de receptores e propriedades associadas a um fenótipo epitelial e no ganho de receptores e características do fenótipo mesenquimal, alterando assim as interações célula-célula e célula-matriz e a polarização celular, bem como promovendo uma dinâmica reorganização do citoesqueleto (Kalluri e Weinberg, 2009).

O desencadeamento do processo de EMT no câncer pode ser induzido por diversos componentes decorrentes da progressão tumoral presentes no microambiente tumoral, como a hipóxia, citocinas e fatores de crescimento. Em resposta a essas alterações, moléculas liberadas no microambiente tumoral, como o TGF- β , induzem a ativação de fatores de transcrição, como SNAIL e TWIST, que por sua vez alteram a expressão de genes associados aos fenótipos epitelial e mesenquimal. Uma das alterações mais marcantes decorrentes da EMT é a diminuição da expressão de E-caderina e o aumento da expressão de N-caderina. A redução de E-caderina leva a perda da polarização epitelial celular, de desmossomos e das junções aderentes que conectam as células. A β -catenina, normalmente associada à E-caderina e aos filamentos de actina, perde seu ancoramento na membrana celular e é internalizada e acumulada no núcleo, induzindo a via de sinalização Wnt, que por sua vez desencadeará novamente a expressão de genes associados ao fenótipo mesenquimal, aumentando a migração e a invasão celular (Nisticò, Bissell e Radisky, 2012; Škovierová *et al.*, 2018).

A EMT é um fenótipo altamente plástico e híbrido: células malignizadas que adquirem características mesenquimais ainda possuem traços epiteliais e interconvertem esses estados em resposta a sinais moleculares e físicos do ambiente. Tal plasticidade é evidenciada durante a colonização de novos tecidos, quando células transformadas fazem o processo inverso, perdendo características mesenquimais e ganhando características epiteliais. Além disso, a EMT está associada a resistência a tratamentos, devido a grande heterogeneidade de fenótipos presentes nas subpopulações de células metastáticas, bem como a

aquisição de programas genéticos que originam células-tronco tumoral, capazes de ser auto-suficientes em sua proliferação e originar tumores com subpopulações celulares diferenciadas (Gloushankova, Zhitnyak e Rubtsova, 2018; Thiery *et al.*, 2009).

2.5 Câncer e o sistema imune

Atualmente a imunoterapia é uma das maiores esperanças no tratamento de diversos tipos de câncer, porém o conceito do papel do sistema imune como um inibidor da progressão tumoral só passou a ser revisitado e amplamente estudado na década de 90, quando modelos animais apropriados e o maior conhecimento das subpopulações do sistema imunológico permitiram a compreensão do papel antitumoral de citocinas, tais como interferon- γ (IFN- γ), e de células citotóxicas, como as células *Natural Killer* (NK) e linfócitos T CD8⁺ (Dunn *et al.*, 2002).

A capacidade de células do sistema imune adaptativo e inato em reconhecer precursores de malignidade e células malignizadas e potencialmente eliminá-las é denominada Imuno Vigilância (ou vigilância imunológica, ou ainda no termo em inglês *immunosurveillance*). Células em transformação inicial ou malignizadas apresentam instabilidade genética, o que pode induzir a formação de proteínas de superfície celular alteradas, as quais são passíveis de reconhecimento pelo sistema imune. Macrófagos e células NK podem provocar a lise de células malignizadas via receptores de imunoglobulinas G (IgG), os quais ligam anticorpos tumorais específicos produzidos por células B, induzindo a citotoxicidade dependente de anticorpo. Células NK também podem reconhecer via receptor NKG2D e eliminar células tumorais pela presença de sinalizadores de estresse celular (como as proteínas da família MIC, associadas ao complexo principal de histocompatibilidade, MHC) nas células malignizadas ou ainda pela diminuição ou ausência do receptor MHC. O braço adaptativo do sistema imune pode ser ativado, por exemplo, via apresentação de antígenos tumorais por células dendríticas e macrófagos, induzindo respostas citotóxicas de células T CD8⁺ via reconhecimento de MHC de classe I nas células malignizadas. Células T CD4⁺ ativadas também podem auxiliar na resposta antitumoral via reconhecimento por MHC de classe II, induzindo uma resposta do tipo Th1 via liberação de citocinas anti-tumorais e maior ativação de células NK e T CD8⁺ (Pandya *et al.*, 2016; Zitvogel, Tesniere e Kroemer, 2006).

Apesar do potencial apresentado pelo sistema imune em eliminar células tumorais e impedir o surgimento de um câncer, todos os organismos, até mesmo os imunocompetentes, ainda desenvolvem essa patologia, o que revela outras faces dessa interação. A ação do sistema imune sobre células tumorais ocorre ao longo de todas as etapas da progressão tumoral, desde seu início e potencial eliminação, passando pela incapacidade de resposta imunológica contra o tumor e chegando até mesmo na subversão do sistema imune, o qual passa a atuar como um promotor tumoral. A compreensão desse fenômeno veio da observação de que células provenientes de tumores desenvolvidos em camundongos imunodeficientes, quando injetadas em camundongos imunocompetentes, nem sempre resultavam na progressão tumoral. Isso ocorre pois as células tumorais dos camundongos imunodeficientes não foram “editadas”, ou seja, células mais ou menos imunogênicas não foram selecionadas ou eliminadas devido a ausência da pressão exercida pelo sistema imune. Desta forma, caso o sistema imune não seja capaz de eliminar a progressão tumoral inicial, a pressão seletiva exercida por ele irá ocasionalmente selecionar clones tumorais menos imunogênicos, “editando” a imunogenicidade tumoral, processo conhecido como a “imunoedição de neoplasias” (*cancer immunoediting*) (Schreiber, Old e Smyth, 2011; Shankaran *et al.*, 2001).

A imunoedição de neoplasias ocorre em três fases, os chamados “três Es”. A primeira fase é denominada Eliminação (*Elimination*): a inicial perda de homeostasia tecidual causada pelo tumor em desenvolvimento induz à produção de citocinas e quimiocinas pro-inflamatórias, recrutando células NK e macrófagos as quais podem apresentar atividades citotóxicas via reconhecimento de receptores nas células malignizadas, além de gerar a produção de IFN- γ , que irá gerar efeitos antitumorais (como redução da proliferação e indução a apoptose) e recrutar ainda mais células do sistema imune inato. Através da apresentação de antígenos tumorais expostos por macrófagos e células dendríticas, o sistema imune adaptativo será ativado, dando origem a células T CD4⁺ que irão apresentar uma resposta do tipo 1 (antitumoral) e a células T CD8⁺ citotóxicas, potencialmente eliminando a neoplasia. Caso a resposta inicial do sistema imune não seja suficiente para induzir a eliminação do tumor em formação, inicia-se a segunda fase, a qual pode se prolongar por anos, e é denominada de Equilíbrio (*Equilibrium*): a constante pressão seletiva imposta pelo sistema imune elimina diversas células malignizadas, porém a crescente instabilidade genômica presente nestas dá origem a clones cada vez

menos imunogênicos; o perfil de citocinas e de subpopulações do sistema imune presente no microambiente muda, ocorre uma diminuição de IFN- γ e células NK infiltradas no tumor. Esta fase é pouco compreendida devido a sua dificuldade de modelagem, apresentando grande similaridade com o estado de dormência que pode ser adotado por células metastáticas. Ao final da fase de equilíbrio, ocorre a expansão de clones tumorais pouco imunogênicos. A terceira e última fase é denominada Escape (*Escape*): linhagens não imunogênicas proliferam sem barreiras impostas pelo sistema imune, empregando uma grande variedade de mecanismos imunossupressores, como diminuição e/ou perda de expressão de MHC, expressão de inibidores da atividade de células T CD8+, como o ligante da proteína programada 1 da morte celular (PD-L1), produção do fator de crescimento tumoral (TGF- β) e interleucina-10 (IL-10) (Bremnes *et al.*, 2016; Dunn, Old e Schreiber, 2004; Mittal, D. *et al.*, 2014). As três fases da imunoeedição são representadas na figura abaixo (Figura 7).

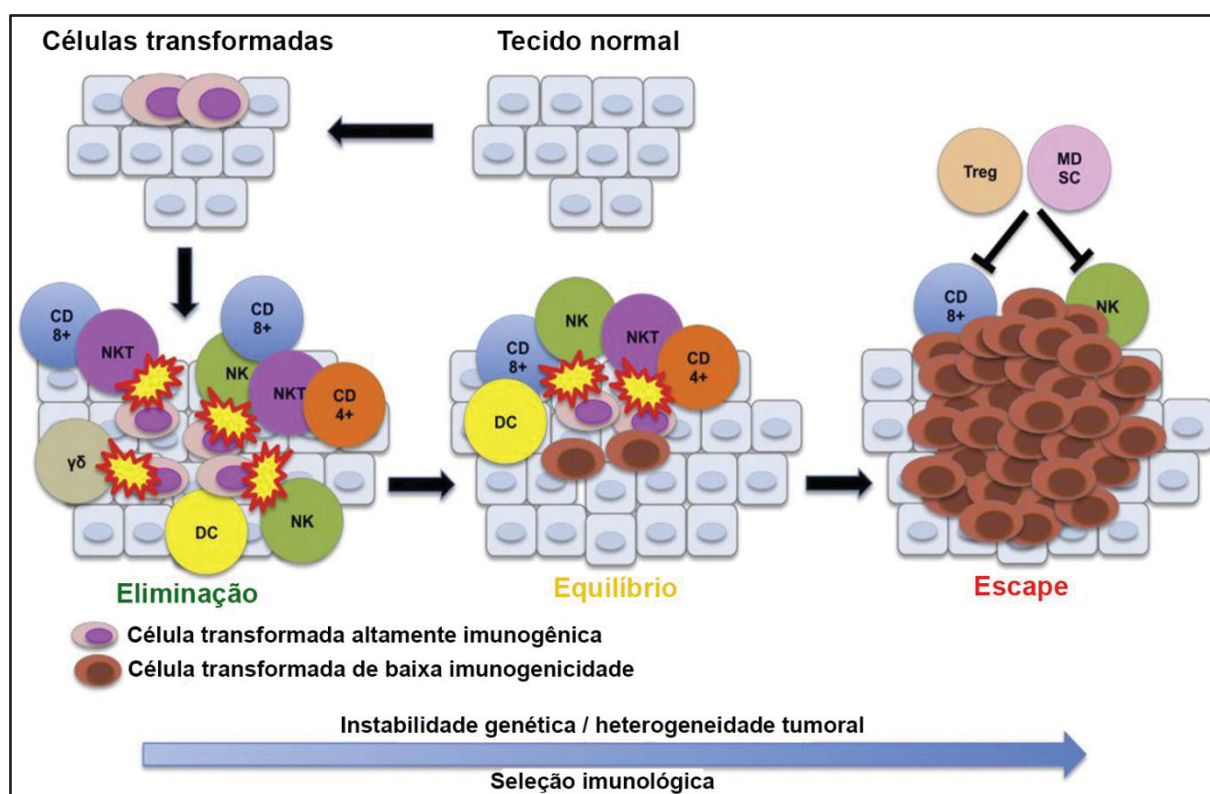


FIGURA 7 – TRÊS “ES” DA IMUNOEEDIÇÃO: As interações entre células do sistema imune e células transformadas compreendem a vigilância imunológica e as três fases da imunoeedição – Eliminação, Equilíbrio e Escape – as quais ocorrem ao longo do desenvolvimento de um tumor, influenciadas pela crescente instabilidade genética característica do microambiente tumoral e a pressão seletiva exercida pelas subpopulações do sistema imune. FONTE: modificado de Bremnes *et al.*, 2016.

Como previamente citado, algumas subpopulações do sistema imune são de especial interesse devido a sua relação com a progressão tumoral, como os macrófagos, os linfócitos T CD4+ e CD8+ e as células NK.

2.5.1 Macrófagos

Macrófagos são células mononucleares residentes em tecidos. São agrupados junto com monócitos, células dendríticas e osteoclastos como fagócitos mononucleares devido a sua grande capacidade fagocítica. Após a fase embrionária, macrófagos são originados a partir de monócitos, que por sua vez são originados a partir de células hematopoiéticas da medula óssea (Gordon e Plüddemann, 2017).

Macrófagos são estimulados por fatores do microambiente em que se encontram, bem como por estímulos autócrinos, adotando uma grande diversidade fenotípica. Apesar da grande simplificação contida nessa descrição devido a grande plasticidade fenotípica dessas células, uma das classificações mais usuais para distinguir as principais funções dessas células são as polarizações M1 e M2, denominadas de ativação clássica e alternativa, respectivamente (Martinez e Gordon, 2014; Mosser e Edwards, 2008).

No contexto tumoral macrófagos associados ao tumor (TAM), os quais apresentam um perfil de ativação do tipo M2, constituem a maior parte desse tipo celular no infiltrado de células do sistema imune dentro do microambiente tumoral, sendo recrutados da corrente sanguínea e dos tecidos e polarizados para um fenótipo pró-tumoral por diferentes estímulos, como citocinas (CSF1, IL-4 e IL-10) e o estresse tecidual (originados pelo estado de hipóxia) (Yang e Zhang, 2017). TAMs apresentam atividades pró-tumorais em todos os estágios da progressão do câncer. Eles promovem o desenvolvimento de um ambiente pró-inflamatório e instabilidade genética nas células malignizadas. Os TAMs secretam grandes quantidades de IL-10, e tem um aumento na expressão de PD-L1 (ligante do receptor de morte programada 1), promovendo imunossupressão da atividade citotóxica de células TCD8+ no microambiente tumoral. No processo metastático, TAMs auxiliam a transição EMT, promovem a degradação da MEC por secretar proteases (MMPs e catepsinas) e liberaram moléculas associadas à preparação do nicho pré-metastático, como TNF- α e VEGF. Além disso, o processo de angiogênese de

tumores primários e focos metastáticos é auxiliado por TAMs, os quais produzem grandes quantidades de VEGF em resposta as baixas concentrações de oxigênio presentes no microambiente tumoral (Fujimura *et al.*, 2018; Pathria, Louis e Varner, 2019).

Por outro lado, macrófagos com a polarização M1 apresentam atividades antitumorais. Este fenótipo de ativação fomenta uma resposta pró-inflamatória via citocinas, como IL-1, IL-6 e TNF- α , e quimiocinas, como CCL2 (também denominada proteína quimioatratora de monócitos 1, MCP-1), induz resposta imune via células T *helper* do tipo 1 – produtoras de IFN- γ , IL-2 e TNF- α – e células T citotóxicas, além de promover diretamente a morte de células tumorais através da produção de espécies reativas de oxigênio (principalmente óxido nítrico) e de ativar células NK e células T CD8+ citotóxicas (Cheng *et al.*, 2019; Najafi, Hashemi Goradel, *et al.*, 2019).

2.5.2 Linfócitos T CD4+ e T CD8+

Células T fazem parte da resposta imune adaptativa, participando do estabelecimento, execução e manutenção da mesma. São originadas a partir de um progenitor comum advindo da medula óssea, migrando para o timo para maturação, onde sofrem rearranjo do receptor de célula T (TCR, responsável pela capacidade de reconhecimento de inúmeros antígenos), dando origem a células duplo positivas com os co-receptores CD4 e CD8. Após as etapas de seleção positiva e negativa ainda no timo, células T positivas para CD4 ou CD8 migram para os tecidos periféricos como células virgens (*naive*). Tais células tornam-se ativas ao encontrar um antígeno que seja reconhecido pelo seu TCR. Estas células ocupam virtualmente todos os tecidos do corpo, sendo sua maioria encontrada em tecidos linfoides (como baço e linfonodos), também estando presentes em mucosas, na pele e até mesmo no cérebro (Kumar, Connors e Farber, 2018).

Células T CD4+ são denominadas células T auxiliares (T *helper cells*) devido a sua capacidade em aumentar e aprimorar a resposta imune de outras subpopulações celulares. As respostas mais bem caracterizadas das células T CD4+ são as do tipo Th1 e Th2. A resposta Th1 é caracterizada como pró-inflamatória mediada por citocinas e quimiocinas como IFN- γ , TNF- α e MCP-1. Devido ao perfil de citocinas e as interações exercidas por essas células, esse tipo de resposta

exerce uma atividade antitumoral, aumentando a expansão e resposta citotóxica das células T CD8⁺ por promover a interação destas com células apresentadoras de antígeno. A resposta induzida por células Th1 também recruta células NKs e macrófagos M1 para o microambiente tumoral, além de participar da manutenção da polarização M1 dos macrófagos devido a produção de IFN- γ . A resposta Th2 inicialmente apresenta atividade antitumoral, recrutando macrófagos para o microambiente tumoral, porém, em vários tipos de câncer, nota-se um aumento da população Th2 em relação à Th1 ao longo do desenvolvimento tumoral. Nesta etapa da progressão, as citocinas (como IL-4, IL-10 e IL-12) liberadas na resposta Th2 induzem imunossupressão, promovendo o recrutamento e a polarização de macrófagos para o fenótipo M2. As citocinas IL-10 e TGF- β , produzidas na resposta Th2, também estão envolvidas na indução de células T regulatórias permitindo que estas inibam a atividade de células NK, T CD8⁺ e macrófagos M1. Células Th2 também induzem um aumento da produção de sinais pró-angiogênicos liberados por outras células presentes no microambiente tumoral, como os CAFs (Burkholder *et al.*, 2014; Kim e Cantor, 2014). Outra população de células T CD4⁺ são os linfócitos T regulatórios (Treg), que apresentam alta expressão de CD25 e são responsáveis pela regulação da resposta imune e manutenção da tolerância imunológica. Tregs são capazes de inibir a atividade de células T CD4, CD8, NKs, células dendríticas e macrófagos. Dado suas características imunossupressoras, Tregs fazem parte do processo de evasão imunológica de tumores, constituindo o infiltrado de células T no microambiente tumoral. Entre outras atividades, Tregs presentes no microambiente tumoral expressam grandes quantidades do antígeno 4 associado ao linfócito T citotóxico (CTLA-4), o qual inibe a atividade de células T CD8 citotóxicas (Chen *et al.*, 2016).

Células T CD8⁺ são denominadas células T citotóxicas, capazes de reconhecer antígenos de patógenos intracelulares e antígenos tumorais expostos em MHC I. Uma vez ativadas por células apresentadoras de antígenos e por sinais estimulatórios advindos de células T CD4⁺, os linfócitos T CD8⁺ migram para o ambiente tumoral, produzindo citocinas pró-inflamatórias com o potencial de induzir a morte celular tanto via liberação de granzimas como por desencadear apoptose dependente de Fas/FasL. A presença de um maior infiltrado de células T CD8⁺ no microambiente tumoral esta relacionada com um melhor prognóstico em vários tipos de câncer, porém diferentes mecanismos intratumorais tendem a promover a

diminuição da atividade dessas células, tais como a hipóxia, a presença de TGF- β e o aumento de expressão de ligantes inibitórios da atividade das células T CD8, como CD80 e CD86 - ligantes inibitórios de CTLA-4- e PD-L1 - ligante de PD-1 (Farhood, Najafi e Mortezaee, 2019; Maimela, Liu e Zhang, 2019).

De forma similar às células T CD4 regulatórias, linfócitos T CD8⁺ CD25⁺ apresentam atividades imunossupressoras. Elas produzem altos níveis de TGF- β e isso provoca redução da proliferação e da resposta do tipo Th1. Além disso, tais células aumentam a expressão de ligantes inibitórios dos receptores CTLA-4 e PD-1, reduzindo a ativação e atividade antitumoral de células T citotóxicas (Vieyra-Lobato *et al.*, 2018).

2.5.3 Células NK

Células NK (*natural* killer) são uma subpopulação de linfócitos com um progenitor linfóide comum a linfócitos B e T na medula óssea, onde ocorre sua maturação. São encontradas na circulação sanguínea e em órgãos linfoides. Células NK atuam via citotoxicidade direta à células tumorais e àquelas acometidas por infecção viral, sem a necessidade de intermédio de apresentação de antígenos. Por não possuírem TCR, a ativação das células NK depende do balanço entre sinais estimulatórios e inibitórios, sendo controlada por um amplo número de receptores de superfície celular, os quais quando em contato com ligantes, inibem (como é o caso do receptor PD1), estimulam (como é o caso do receptor NKp46), ou ainda desempenham papel duplo, inibindo ou estimulando sua atividade citotóxica (como é o caso do receptor Ly49, que reconhece a presença de MHC próprio, inibindo a célula NK, porém também pode detectar a ausência da expressão de MHC, estimulando a célula NK). Uma vez ativadas, células NK liberam grânulos contendo perforina e granzima B na interface de interação com a célula alvo, induzindo a formação de poros na membrana plasmática e a apoptose da célula alvo, por vias dependentes e independentes de caspase, respectivamente. Além disso, células NK liberam citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ (Abel *et al.*, 2018; Choucair *et al.*, 2019).

Apesar da grande capacidade de eliminação de células tumorais por células NKs, a função destas é altamente inibida no microambiente tumoral, diminuindo sua capacidade de infiltração e citotoxicidade. Dentro do tumor, heparanases clivam

proteoglicanos de heparam sulfato presentes na membrana celular, potencialmente impactando o reconhecimento dessas células por células NK. O aumento da sialilação em células tumorais é reconhecido por células NK, resultando em inibição de sua atividade. Galectinas, como a galectina 3, superexpressa em diversos tumores, como o melanoma, diminuem a capacidade citotóxica das células NK. Por outro lado, células NK apresentam uma grande capacidade de eliminação de células metastáticas. A atividade de metaloproteinases no microambiente tumoral promove a clivagem de vários receptores, como o MIC, que sinaliza o estresse celular e que poderia ser reconhecido por células NK, ativando-a (Rossi, Trindade e Souza-Fonseca-Guimaraes, 2020). Além disso, a transição epitélio-mesenquimal, a qual induz o aumento de expressão de ligantes de NKG2D, como o MIC, leva à perda de receptores inibitórios de células NK, como o NKIR (López-Soto *et al.*, 2017).

Devido ao promissor papel das células NK no câncer, diferentes estudos pré-clínicos, clínicos e tratamentos aprovados visando ampliar a atividade destas células vêm sendo realizados e empregados (Hu *et al.*, 2019). Esses ensaios abordam diferentes dinâmicas da biologia das células NK, como por exemplo, usando anticorpos contra o receptor inibitório NKIR (Benson *et al.*, 2011), impedindo a clivagem proteolítica dos receptores MIC (Andrade, De *et al.*, 2018) e o uso de citocinas estimulatórias, como IL-2 e IL-15 (Vacchelli *et al.*, 2016).

2.6 Tratamentos contra o câncer e o melanoma

Apesar de ainda figurar como uma das maiores causas de mortes no mundo, os últimos anos foram de grandes avanços no combate ao câncer, graças ao diagnóstico precoce, a ampliação ao acesso a centros médicos e ao desenvolvimento de novas terapias. Até meados do ano de 1900, a remoção cirúrgica e a cauterização dos tumores primários eram as únicas opções de intervenção. O surgimento da radioterapia em 1920 e da quimioterapia em 1940 representou um grande salto no tratamento de tumores. Por fim, nos últimos 40 anos, as terapias alvo e mais recentemente a imunoterapia representam grandes revoluções no combate a vários tipos de cânceres (Falzone, Salomone e Libra, 2018).

A remoção cirúrgica continua sendo a primeira ação no combate a tumores primários sólidos, e o advento da radioterapia e da quimioterapia permitiu um uso

mais conservador e menos invasivo dessa forma de intervenção, obtendo-se resultados promissores através de tratamentos complementares envolvendo essas três técnicas para várias formas de manifestação do câncer. Além da quimioterapia, como previamente citado, outras terapias sistêmicas – terapia alvo, terapia hormonal, imunoterapia e transferência celular - têm sido amplamente empregadas, mas seu sucesso ainda é condicionado a um painel genético favorável, não sendo efetivo para todos os tipos de câncer e nem mesmo para todos os pacientes com o mesmo tipo de patologia. Além disso, a identificação de marcadores moleculares indicativos de prognósticos para determinados tipos de câncer têm sido amplamente usada, bem como o conhecimento de genes de risco e a identificação dos mesmos em pacientes com predisposição hereditária, permitindo o acompanhamento, diagnóstico precoce e tratamentos individualizados (Burstein *et al.*, 2017; Miller *et al.*, 2019; Urruticoechea *et al.*, 2010).

O desenvolvimento de quimioterápicos teve início em 1942, quando componentes do gás mostarda foram testados no tratamento de um paciente com linfoma do tipo não Hodgkin. Em 1965, a *Food and Drug Administration* (FDA) aprovou o primeiro quimioterápico, a ciclofosfamida. Esses compostos e vários outros quimioterápicos baseiam-se em alquilantes de DNA, capazes de causar danos ao material genético, levando as células a apoptose, sendo extremamente pouco seletivos em seu alvo (Chabner e Roberts, 2005) e, conseqüentemente, causando muitos efeitos colaterais.

A primeira terapia alvo aprovada pela FDA foi o tamoxifeno para o tratamento de câncer de mama, em 1977, consistindo em um antagonista do receptor de estrogênio, impedindo assim a ligação entre este hormônio e seu receptor (Yan, Rosen e Arteaga, 2011). Terapias alvo consistem de pequenas moléculas sintéticas ou anticorpos monoclonais administrados de forma sistêmica ou inoculados no tumor. Estes componentes têm a capacidade de interagirem com ligantes específicos ou receptores, interferindo com vias de sinalização sabidamente alteradas para determinados tipos de câncer (Gerber, 2008).

Imunoterapias, por sua vez, baseiam-se no uso dos princípios da vigilância imunológica e imunoedição como ferramentas contra o câncer, empregando para isso citocinas e quimiocinas, explorando os pontos de checagem do sistema imune e aprimorando as capacidades das subpopulações imunológicas em reconhecerem e eliminarem células tumorais. Apesar de uma forma rudimentar, a imunoterapia teve

seus primeiros usos como tratamento contra o câncer em 1891, quando William Coley tratou seus pacientes acometidos com câncer usando misturas ativas e inativas de *Streptococcus pyogenes*, estimulando o sistema imune de forma generalizada. O longo período de incertezas sobre o papel do sistema imune no câncer postergou o surgimento de tratamentos comerciais empregando a imunoterapia, sendo que o primeiro – o uso da citocina interferon $\alpha 2$ no tratamento de leucemia de células pilosas - foi aprovado apenas em 1986 (Dobosz e Dzieciatkowski, 2019; Eno, 2017).

O tratamento do câncer torna-se mais difícil e unicamente paliativo quando surgem focos metastáticos, ponto em que os avanços científicos não têm gerado grandes ganhos de sobrevida. Células capazes de invadir e colonizar outros tecidos apresentam o maior grau de modificações genéticas entre as células malignizadas, e essa heterogeneidade pode ser um ponto de resistência ao tratamento. Outra dificuldade reside no mecanismo de dormência habilitado por células metastáticas: uma célula metastática em dormência pode gerar recorrências anos após o aparecimento do tumor primário, e esse mecanismo continua fora do alcance das terapias atuais (Steeg, 2016).

O tratamento do melanoma baseia-se no estágio de desenvolvimento da patologia. Em casos de suspeita de melanoma primário, baseado nas observações do previamente citado “ABCDE” do melanoma, bem como no levantamento de riscos associados ao desenvolvimento da doença (idade avançada, histórico familiar de patologias da pele, presença de múltiplos *nevi*, histórico de exposição ao Sol e uso de bronzeamento artificial) realiza-se a biópsia do *nevus*. Durante o procedimento, observa-se a escala de Breslow, que determina a profundidade da pele invadida pela lesão. Com base nessa escala, remove-se juntamente com o *nevus* uma borda de segurança ao redor do mesmo, a qual vai de 0.5 cm para melanoma *in situ* (apenas na epiderme) a até 2 cm para lesões mais profundas do que 1 cm. Através da histologia desta biópsia, juntamente com diagnósticos de imagem, análises de biomarcadores sanguíneos e, em casos de suspeita de progressão da doença, análise de linfonodos próximos da lesão, aplicam-se classificações de estadiamento, denominadas TNM: T de tumor, referente a escala de Breslow para o tumor primário; N de linfonodo (advindo de *lymph Node* em inglês) que vai determinar a presença ou ausência de tumor nos linfonodos próximos, bem como a quantidade de focus detectados; e M de metástase, distinguindo a presença ou ausência e se possível a

localização da mesma. Baseado nas classificações TNM, obtém-se um estágio clínico da doença, representado pelos números romanos de I a IV e por subdivisões indicadas por letras. Nos estágios I e II enquadram-se melanomas que não foram detectados em linfonodos próximos. O estágio III indica melanomas primários com presença de focos em 1 ou mais linfonodos próximos. O estágio IV representa melanomas que metastizaram para tecidos e órgãos distantes. Pacientes com melanoma em estágio I passíveis de remoção cirurgica fazem este procedimento sem a necessidade de terapias adicionais, devendo ser monitorados posteriormente para detecção de recorrência (prática adotada em todos os estágios do melanoma). Pacientes com tumores que não podem ser removidos ou não totalmente removidos nos estágios I e II são indicados ao uso de radioterapia. A partir do estágio III, as terapias sistêmicas devem ser empregadas em combinação, como as terapias alvo e a imunoterapia, tendo como base o perfil genético do tumor (Hartman e Lin, 2019; Michielin *et al.*, 2019).

Em média mais de 97% dos pacientes diagnosticados com melanoma em estágio I sobrevivem mais de 5 anos. Mais de 82% dos pacientes diagnosticados no estágio II sobrevivem mais de 5 anos. No estágio III, as taxas de sobrevida variam significativamente de acordo com a classificação TNM: mais de 93% dos pacientes em estágio IIIA vivem mais de 5 anos, enquanto apenas 32% daqueles diagnosticados como IIID sobrevivem esse período. O melanoma metastático, referente ao estágio IV, diminui drasticamente as taxas de sobrevida: 62% dos pacientes com metástases em pontos distantes da pele e/ou linfonodos (classificação M1a) apresentam sobrevida de um ano, contra apenas 33% dos pacientes com metástase em órgãos vitais (Hartman e Lin, 2019). O quadro metastático de melanoma ainda carrega outro grande risco: melanoma metastático é um dos tipos de câncer com maior probabilidade de desenvolvimento de metástases cerebrais, sendo que a maior parte dos pacientes nesse estágio da doença irá desenvolver essa complicação. Pacientes com esse quadro apresentam tempo médio de sobrevida menor do que 6 meses (Cohen *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2019).

A tendência de diminuição de sobrevida ao longo dos estágios do melanoma é semelhante no Brasil. Em uma análise com dados de 1848 pacientes, a taxa de sobrevida de 5 anos foi de 92.4% para melanomas no estágio I, 69.5% para estágio II, 53.5% para estágio III e 22% para o estágio IV. Apenas 20% dos pacientes tratados unicamente com dacarbazina tiveram uma sobrevida de 5 anos, contra

34.2% naqueles que receberam tratamento conjunto com imunoterapia ou terapia alvo (Costa *et al.*, 2019). Em um estudo com análise dos tratamentos indicados para pacientes com melanoma em um hospital da rede pública no Brasil, 98% dos pacientes tiveram como primeira linha de tratamento um composto minimamente eficaz, como a dacarbazina, classificado desta forma devido a sua taxa de resposta menor do que 10% e ausência de impacto significativo na taxa de sobrevida e no tempo de progressão livre da doença (Kaliks *et al.*, 2019).

Desde 1974 a Dacarbazina (Dtic), um alquilante de DNA, é o quimioterápico de escolha no tratamento do melanoma metastático (Domingues *et al.*, 2018). Ao longo dos anos, diferentes ensaios clínicos mostraram a Dtic como um quimioterápico equivalente a outros que foram desenvolvidos, como a temozolomida, assim como também demonstram a baixa taxa de resposta a Dtic, com uma média de sobrevida de 6 a 9 meses, e uma taxa de sobrevida de 5 anos de apenas 6% dos pacientes. Devido à falta de seletividade, muitos efeitos colaterais são relatados com o uso da Dtic, como leucopenia (redução de leucócitos no sangue), trombocitopenia (redução de plaquetas), vômitos, fadiga, dores nas articulações, febre, danos hepáticos e renais (Eggermont e Kirkwood, 2004; Kim *et al.*, 2010; Teimouri, Nikfar e Abdollahi, 2013).

Entre as terapias alvo aprovadas para o tratamento do melanoma metastático estão os inibidores de BRAF – vemurafenib, dabrafenib e encorafenib – e os inibidores de MEK – trametinib, cobimetinib e binimetinib (Domingues *et al.*, 2018). Os genes *BRAF* e *MEK* codificam proteínas da via de sinalização de proteínas quinase ativadas por mitógenos (MAPK; consistindo da via RAS => BRAF => MEK1/2 => ERK), que são associadas com sinais de proliferação e crescimento celular. Aproximadamente 70% dos melanomas apresentam mutações nessa via. A mutação V600E no gene *BRAF* é a mais comum no melanoma, representando um ganho de função, no qual o gene passa a ser constitutivamente ativo. A combinação de inibidores de BRAF e MEK aumenta a sobrevida de pacientes em 10 a 14 meses em média. Entre os pontos negativos do uso dessas terapias alvo no tratamento de melanoma metastático, estão o desenvolvimento de resistência, através de reativação e mutações na via de sinalização MAPK em outras etapas da mesma; a limitação no uso dessas intervenções, devido ao perfil genético do tumor; e aos efeitos colaterais, sendo os mais comuns a fadiga, doenças de pele, redução da

função renal, náusea, diarreia, febre e dores nas articulações (Heo *et al.*, 2016; Lorentzen, 2019; Yu *et al.*, 2019).

Os inibidores dos pontos de checagem do sistema imune anti-CTLA-4 (nome comercial ipilimumab) e anti-PD-1 (nivolumab e pembrolizumab) são as principais imunoterapias aprovadas pelo FDA para tratamento do melanoma. O receptor CTLA-4 é expresso em células T CD4⁺ e em células T CD8⁺ em resposta a interação do TCR destas com MHC. No câncer (e no melanoma) a interação TCR com MHC ocorre principalmente nos linfonodos e parcialmente no microambiente tumoral durante a apresentação de antígenos tumorais por uma APC para uma célula T virgem. CTLA-4 é estruturalmente semelhante ao receptor CD28 (também expresso nessas células), mas sua atividade é oposta: enquanto a ligação entre CD28 e seus ligantes CD80 (B7-1) e CD86 (B7-2) envia sinais de proliferação e ativação, a ligação entre CTLA-4 e esses mesmos ligantes (a qual possui significativamente maior avidéz) induz a aproximação ao limite de ativação da célula T, diminuindo sua atividade e induzindo exaustão celular, sendo um importante mecanismo de atenuação da resposta imunológica. O anticorpo monoclonal anti-CTLA-4 liga-se em seu receptor, impedindo a ligação entre CTLA-4 e B7, permitindo assim a interação CD28 e B7. Desta forma, os inibidores dos pontos de checagem resultam em diminuição do envio de sinais inibitórios para as células T, permitindo maior ativação e proliferação destas durante a apresentação de neoantígenos tumorais por APCs, sendo este o principal mecanismo de ação deste tipo de imunoterapia elucidado até o momento (Buchbinder e Desai, 2016; Wei, Duffy e Allison, 2018; Wolchok e Saenger, 2008).

O receptor PD-1 é expresso em células T CD4⁺ e células T CD8⁺ em resposta a citocinas inflamatórias e ao estímulo proveniente da interação entre TCR e MHC, permanecendo exposto na superfície celular dessas células quando no estado de exaustão. Seus ligantes – PD-L1 e PD-L2 – são expressos em tecidos não linfóides e APCs – participando assim da atenuação da resposta imunológica – e super expressos em alguns tumores e em TAMs, como o melanoma, participando da evasão imunológica. O anticorpo monoclonal anti-PD-1 tem seu mecanismo antitumoral associado principalmente com a atividade efetora das células T CD8⁺ no microambiente tumoral, impedindo a ligação aos receptores inibitórios e ao mesmo tempo recuperando a atividade de células T exaustas (ou seja, com diminuída capacidade de secreção de citocinas e aumento da quantidade de receptor

inibitórios) infiltradas no tumor (Buchbinder e Desai, 2016; Wei, Duffy e Allison, 2018).

Diferentes ensaios clínicos já demonstram o aumento do tempo de sobrevida de pacientes com melanoma metastático tratados com imunoterápicos como monoterapia ou em combinação com outros imunoterápicos ou outros tratamentos. O tratamento com ipilimumab e dacarbazina gerou sobrevida de 11,2 meses, comparado a 9,2 meses para o grupo que recebeu apenas dacarbazina (Rogiers *et al.*, 2019). Em outros estudo com acompanhamento de longo tempo de sobrevida, 18,2% dos pacientes tratados com ipilimumab e dacarbazina sobreviveram 5 anos ou mais, contra apenas 8,8% dos pacientes que receberam dacarbazina mais placebo (Maio *et al.*, 2015). A combinação dos imunoterápicos nivolumab e ipilimumab também apresenta maior sobrevida do que a monoterapia: 52% dos pacientes com melanoma metastático que receberam ambos imunoterápicos sobreviveram 5 anos ou mais, contra 44% dos que receberam apenas nivolumab e 26% dos que receberam apenas ipilimumab (Larkin *et al.*, 2019).

Apesar dos grandes avanços na sobrevida dos pacientes, as imunoterapias também apresentam pontos negativos. Em todos os ensaios clínicos previamente citados para imunoterápicos, efeitos colaterais leves, medianos e severos são detectados, como lesões na pele, danos renais e hepáticos e o desenvolvimento de doenças autoimunes. Além disso, a eficácia desses tratamentos é dependente da genética tumoral e sua relação com a imunogenicidade: tumores com maior taxa de mutações são mais imunogênicos, sendo mais afetados pelos imunoterápicos; pacientes com tumores que apresentam maior infiltrado de linfócitos T respondem melhor aos tratamentos (Seidel, Otsuka e Kabashima, 2018).

Os avanços recentes no tratamento de melanoma metastático são significativos, mas o estágio metastático continua sendo um grande desafio clínico. Os efeitos colaterais de todas as terapias disponíveis diminuem drasticamente a qualidade de vida dos pacientes, podendo até mesmo ser motivo de abandono e desistência do tratamento. O perfil genético do tumor e sua consequência em heterogeneidade e imunogenicidade torna os medicamentos mais modernos inefetivos para parte dos pacientes, e quando funcionam há a possibilidade de desenvolvimento de resistência aos mesmos (Kroschinsky *et al.*, 2017; Melis *et al.*, 2017). Por fim, os avanços na descoberta de novas drogas acarretam altos custos nos fármacos desenvolvidos, gerando dúvidas de como os pacientes e os sistemas

de saúde serão capazes de arcar com essas despesas, além das grandes disparidades nos tratamentos adotados por aqueles que podem e aqueles que não podem pagar. Em um estudo feito com valores de 2017 para o tratamento de melanoma metastático nos Estados Unidos, o custo total do tratamento com dacarbazina foi de em média, US\$ 7013,00, enquanto que a associação entre dabrafenib e trametinib custava em média, US\$ 207338,00 (Gorry, McCullagh e Barry, 2020).

Com base nesses desafios, a busca de novos compostos que possam auxiliar no combate ao melanoma metastático, apresentando menores toxicidades e menor custo é de grande interesse.

Uma das possibilidades de novas moléculas são compostos obtidos de fontes naturais. A medicina tradicional empregando produtos naturais remonta a tempos pré-históricos. Ao longo de milhares de anos a evolução originou organismos com uma gigantesca diversidade química de biomoléculas, as quais têm originado medicamentos para os mais diversos tipos de doenças, incluindo compostos aprovados por agência regulatórias ao redor do mundo como tratamento de escolha (Yuan *et al.*, 2016). Entre essas novas biomoléculas, há um extenso relato na literatura do papel dos polissacarídeos obtidos de diferentes organismos, com muitos deles apresentando inúmeras atividades antitumorais (Zong, Cao e Wang, 2012).

2.7 Polissacarídeos de fontes naturais e suas atividades farmacológicas e antitumorais

Polissacarídeos são macromoléculas de origem natural formadas por resíduos de monossacarídeos unidos por ligações glicosídicas. Essas estruturas podem ser lineares ou ramificadas, compostas por apenas um tipo de monossacarídeo (homopolissacarídeos) ou mais de um tipo (heteropolissacarídeos) e apresentar diferentes graus de sulfatação e ou de outros radicais. São encontrados principalmente como compostos estruturais, como a celulose na parede celular, e como reservatórios energéticos, como o amido e o glicogênio. Devido a sua enorme variedade de estruturas, uma grande diversidade de atividades biológicas já foi descrita para esses compostos, como atividades anti-virais, anti-oxidantes, pró e anti-inflamatórias, anticoagulantes, imunomoduladoras e antitumorais (Bajpai *et al.*, 2014; Yu *et al.*, 2018).

A primeira evidência de uso de polissacarídeos no tratamento do câncer coincide com os primeiros passos da imunoterapia: quando William Coley há mais de 100 anos tratava pacientes com extratos de *Streptococcus pyogenes*, induzindo uma resposta imunomoduladora antitumoral, parte dos tratamentos era composto de polissacarídeos. Na descrição destes experimentos, Nauts relata outros experimentos iniciais sendo desenvolvidos com esse tipo de composto (Nauts, Swift e Coley, 1946; Zhang *et al.*, 2007). Desde então o campo do estudo das atividades antitumorais desses compostos cresceu rapidamente, e atualmente diversas modulações em linhagens tumorais *in vitro* e *in vivo* são reportadas para polissacarídeos de diferentes fontes, como citotoxicidade seletiva, diminuição da proliferação e arrasto do ciclo celular, redução da migração e invasão, e redução do crescimento de tumores sólidos e tumores de metástase experimental (Khan *et al.*, 2019). A Tabela 1 apresenta alguns exemplos de atividades *in vitro* e *in vivo* de polissacarídeos obtidos de fungos, algas e plantas em diferentes linhagens tumorais.

Tabela 1: Atividades *in vitro* e *in vivo* de polissacarídeos em modelos tumorais.

Fonte	Estrutura	Modelo	Concentração/Dose	Efeito
<i>Rubus idaeus</i> L. (vegetal); YANG et al, 2015	Ramnose, arabinose, xilose, manose, glucose e lactose	Tumor sólido subcutâneo (linhagem B16F10 / camundongo C57BL/6)	Concentrações de 1 a 256 µg/mL; doses de 100, 200 e 400 mg/Kg via gavagem, diário, 13 dias de tratamento; início no 5º dia após inoculação.	Ausência de citotoxicidade <i>in vitro</i> ; diminuição do volume tumoral; aumento de células inflamatórias no tecido tumoral; potenciação do quimioterápico.
<i>Lentinus edodes</i> (fungo); Jinglin WANG et al, 2016	Lentinan β (1-3) D-glucose	HT-29 (<i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>). Tumor sólido de HT-29 em BALBc-nude	Concentrações de 12.5 a 1600 µg/mL; Doses de 0.2, 1 e 5 mg/Kg via intracaudal dia sim/dia não por 21 dias; início no 2º dia após a inoculação.	Indução à apoptose via Caspase-3; diminuição do volume tumoral; aumento da produção de ROS e TNF-α (<i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>).
<i>Ascophyllum nodosum</i> (alga marrom); ABU et al, 2015	Fucana sulfatada	B16-F10 (<i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>); modelo de metástase experimental em camundongos C57BL/6	Concentrações de 10, 100 e 1000 µg/mL; dose de 25mg/Kg via subcutânea; diário, do dia 1º ao 10º	Diminuição de adesão, migração e invasão da linhagem B16-F10; diminuição do número de tumores primários nos pulmões.
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (fungo); MO et al, 2017	(1->3)β-D-glucana	Sarcoma 180 (rato Kunming)	Doses de 50, 100 e 200mg/Kg via gavagem, diário durante 16 dias	Diminuição do peso e volume tumoral; aumento de células T CD4+ e CD8 +
<i>Tarphochlamys affinis</i>(vegetal); TANG et al, 2016	D-arabinose (10%) D-glucose (90%)	Hepatocarcinoma H22 (Rato Kunming)	Doses de 70, 140 e 280mg/Kg via gavagem, por 10 dias (diário ou dia sim/dia não)	Diminuição do volume e peso tumoral; proliferação de células do sistema imune provenientes do baço e do timo; aumento de IL-2, IL-6 e IFN-γ no soro dos camundongos.
<i>Codium fragile</i> (alga verde); SURAYOT et al, 2016	Manose e glucose	HeLa (linhagem tumoral) e NK92	Concentração de 5 a 1000 µg/mL	Aumento da proliferação de células NK, expressão de granzima-B, IFN-γ, Nkp30 e FasL; aumento da citotoxicidade das células NK contra HeLa.
<i>Panax ginseng</i> (vegetal); ZHOU et al 2014	Liofilizado do extrato (estrutura não informada)	Câncer de pulmão da linhagem Lewis em camundongo C57BL/6	50, 100 e 200mg/Kg, gavagem, diário a partir do segundo dia de inoculação das células tumorais, por 20 dias	Diminuição do peso e volume tumoral; diminuição de células CD8+ e aumento de células CD4+; aumento de IL-2 e IFN-γ no soro dos camundongos; aumento da atividade de células NK.

Fonte: próprio autor (2020).

A relevância da atividade antitumoral de polissacarídeos é também expressa em ensaios clínicos. Em uma busca no banco de dados “Clinical Trials”, do *National Health Institute* (NIH) dos Estados Unidos, empregando os termos “*cancer*” e “*polysaccharide*”, 22 ensaios clínicos com polissacarídeos de origem natural são encontrados. Entre estes, câncer de próstata, mama, esôfago e colorretal são algumas das manifestações clínicas estudadas, avaliando atividades antitumorais

diretamente exercidas nos tumores, além de atividades imunomoduladoras, adjuvantes de quimioterápicos e como suplementos para melhorar o estado de saúde geral de pacientes em tratamento (Clinical Trials, 2020).

Dados recentes de nosso grupo de pesquisas (Laboratório de Estudos de Polissacarídeos Sulfatados e Laboratório de Estudos de Células Inflamatórias e Neoplásicas, UFPR) também apontam para promissoras modulações celulares em linhagens malignizadas quando tratadas com polissacarídeos extraídos de fontes naturais. Santi e colaboradores mostraram um polissacarídeo rico em fucose extraído da alga *Spatoglossum schoederi* que diminuiu a capacidade invasiva da linhagem B16-F10 em concentrações não citotóxicas (Santi). Biscaia e colaboradores (2017) mostraram que uma manogalactana extraída do cogumelo *Pleorotus eryngii* foi capaz de diminuir a capacidade invasiva da linhagem B16-F10, sem gerar citotoxicidade ou indução a apoptose. Em estudos *in vivo*, o composto mostrou-se capaz de diminuir o crescimento de tumores induzidos pela linhagem B16-F10 em camundongos C57Bl/6 (Biscaia *et al.*, 2017), sem apresentar efeitos colaterais aparentes. Bellan e colaboradores (2020) descrevem uma heteroramnana sulfatada obtida da alga verde *Gayralia brasiliensis* não citotóxica para a linhagem C57Bl/6 capaz de reduzir a migração e a invasão celular, além de aumentar a marcação de CD44 (associado a localização e atividade de metaloproteinases) (Bellan, Mazepa, E, *et al.*, 2020).

O presente trabalho buscou investigar o possível efeito antitumoral de um polissacarídeo, utilizando uma homogalactana sulfatada obtida da alga verde marinha *Codium isthmocladum*. Vale salientar que devido a grande complexidade de nichos gerados no ambiente marinho este é uma das maiores fontes de biomoléculas únicas com potencial farmacológico, sendo grande parte dessas produzidas por algas (Hamed *et al.*, 2015). Algas marinhas possuem uma grande diversidade de espécies e apresentam distribuição global, sendo de grande importância econômica e industrial graças a seus metabólitos secundários (Buschmann *et al.*, 2017; Pereira, 2018).

Uma classe de compostos no ambiente marinho de especial interesse são os polissacarídeos sulfatados, encontrados muito mais abundantemente nesse ecossistema do que no ambiente terrestre, devido a alta concentração de íons sulfato nos mares e oceanos e a presença de sulfatases pelas algas (Helbert, 2017). Esses polissacarídeos possuem atividades biológicas que já foram demonstradas

para diferentes patologias humanas, como doenças cardiovasculares – agindo como anticoagulantes, antitrombóticos e anti-hipertensivos (Zaporozhets e Besednova, 2016), atuando como imunomoduladores (pela ativação de linfócitos e macrófagos) exercendo atividades pró e anti-inflamatórias inclusive em modelos tumorais (Manlusoc *et al.*, 2019; Yu *et al.*, 2018), e diretamente modulando características malignizadas de células tumorais – reduzindo angiogênese, invasão e a progressão tumoral (Alves *et al.*, 2018).

Os efeitos gerados em linhagens tumorais em resposta a polissacarídeos extraídos de algas são variados. Estudos mostram que esses compostos podem induzir a apoptose celular através da fosforilação e consequente ativação de quinases reguladas por sinal extracelular (ERK 1/2) e c-jun N-terminal quinases (JNK), além de liberação do citocromo C no ambiente citosólico, em linhagens celulares de leucemia (Jin *et al.*, 2010); outro estudo demonstra atividades imunomodulatórias, gerando aumento de proliferação de células do sistema imune e maior atividade de macrófagos, em um modelo *in vivo* de carcinoma hepatocelular (Fan *et al.*, 2012); em ensaios *in vitro* empregando dois compostos sulfatados extraídos das algas *Sargassum henslowianum* C. Agardh e *Fucus vesiculosus*, Ale e colaboradores evidenciaram uma diminuição dose dependente na proliferação celular da linhagem B16-F10 tratada com esses compostos, além de indução da apoptose, provavelmente associada ao aumento da atividade da caspase 3, o qual também foi verificado no estudo (Ale *et al.*, 2011).

Entre os polissacarídeos obtidos de algas marinhas, um grupo relevante é o de galactanas sulfatadas. Estas são um dos homopolissacarídeos sulfatados mais estudados, encontrados principalmente em algas vermelhas, verdes e marrons, sendo que normalmente apresentam grande massa molecular (60 a 100 kda), são obtidas exclusivamente de organismos marinhos, apresentam grande carga eletronegativa, o que favorece interações moleculares, além de apresentarem grande especificidade com proteínas (Pomin, 2010). Entre as atividades biológicas descritas para esses compostos, estão a ação anticoagulante, antitrombótica, antioxidante, anti e pró-inflamatória, imunomodulatória e antitumoral – induzindo apoptose celular, aumentando o infiltrado de células imunes no tumor e reduzindo a angiogênese e a progressão tumoral (Liu *et al.*, 2019).

Galactanas sulfatadas obtidas de espécies de algas verdes do gênero *Codium* apresentam atividades biológicas já descritas na literatura, como a

atividade anticoagulante (espécie *Codium divaricatum*) (Li *et al.*, 2015), a ativação de macrófagos via produção de óxido nítrico e citocinas (espécie *Codium fragile*) (Lee *et al.*, 2010), e a proteção a danos teciduais em rins e fígado de camundongos alimentados com uma dieta rica em gorduras (espécie *Codium fragile*) (Kolsi *et al.*, 2017).

Compartilhando características estruturais aos compostos já citados, a alga verde *Codium isthmocladum* biosintetiza uma homogalactana altamente sulfatada composta majoritariamente de β -D-galactopiranosose 3-O-ligado e unidades 4-O-sulfatadas, com massa molecular aproximada de 14 kDa. Espécimes dessa alga foram coletadas na costa de Natal, no Rio Grande do Norte, e esse polissacarídeo foi extraído e caracterizado para utilização no presente trabalho (Farias *et al.*, 2008). Para referências futuras, esse composto passará a ser denominado CI.

Em um estudo prévio empregando o polissacarídeo CI, Costa e colaboradores (2010) testaram e compararam a atividade de diferentes compostos obtidos de espécies de alga marinha quanto a sua atividade anticoagulante, antioxidante e citotóxica. O composto CI apresentou atividade anticoagulante na concentração de 0.01 mg/100 μ L de plasma, como evidenciado pelo teste de tempo de tromboplastina parcial ativada (APTT), e induziu diminuição da viabilidade celular de forma concentração dependente (de 10 μ g/ml a 2000 μ g/ml; diminuições de aproximadamente 20% e 40%, respectivamente) na linhagem HeLa (Costa *et al.*, 2010).

Empregando o composto CI na linhagem B16-F10, Bellan (2016) mostrou uma diminuição na captação do corante Vermelho Neutro, a qual foi dose dependente (concentrações de 1, 10, 100 e 1000 μ g/ml, 72h) mas não superior a valores que indicam citotoxicidade celular (*International Organization for Standardization*, 2009), sem indução a apoptose na concentração de 100 μ g/mL (escolhida para avaliação de modulação de fenótipos malignizados), como mostrado pelo ensaio de Rhodamina 123 e Anexina V/7AAD. Nas mesmas condições experimentais, o composto CI não diminuiu a densidade celular da linhagem B16-F10 (ensaio de Cristal Violeta, concentrações de 1, 10, 100 e 1000 μ g/ml, 72h) e não alterou o perfil do ciclo celular (ensaio com o kit PI/RNase, concentrações de 10 e 100 μ g/ml, 72h). Porém de forma promissora, o composto CI diminuiu significativamente a formação de colônias das células B16-F10 na concentração de 100 μ g/ml, em 72h de tratamento. O polissacarídeo CI também

induziu efeitos promissores na linhagem de macrófagos RAW 264.7. Em 72h de tratamento na concentração de 100 $\mu\text{g/ml}$, a marcação positiva de CD54 e a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) foram aumentadas (Bellan, D. L., 2016). Os principais efeitos do composto CI podem ser visualizados na figura abaixo (Figura 8).

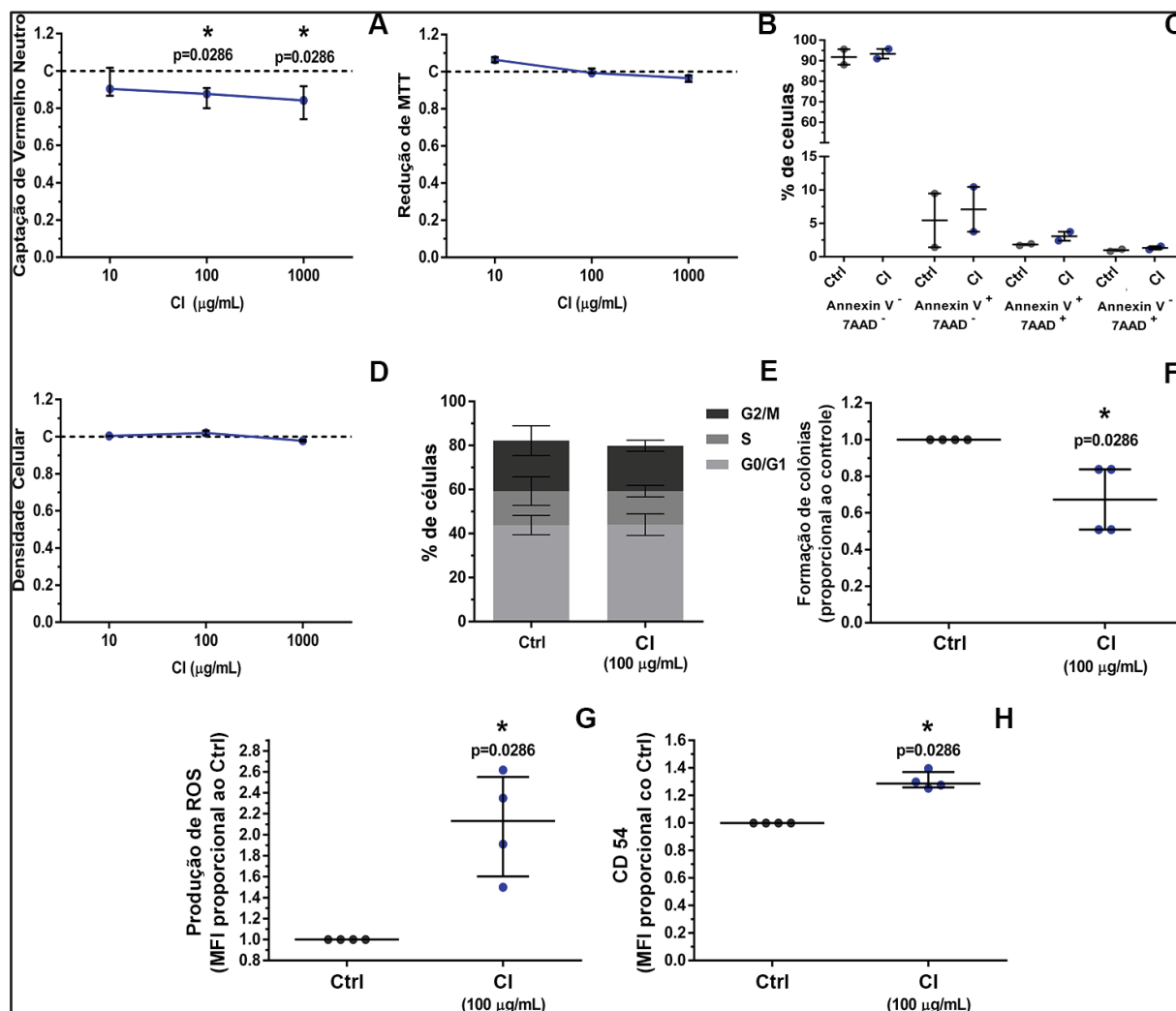


FIGURA 8 – ATIVIDADES JÁ OBSERVADAS DO POLISSACARÍDEO CI: Estudos prévios nas linhagens B16-F10 e RAW 264.7 demonstraram atividades biológicas induzidas pelo composto CI. (A) Captação de Vermelho Neutro. (B) Redução de MTT. (C) Anexina V + 7AAD. (D) Densidade Celular. (E) Ciclo celular. (F) Formação de colônias. (A-F) Linhagem de melanoma murino B16-F10. (G) Produção de ROS. (H) Marcação de CD54. (G-H) Linhagem de macrófagos murinos RAW 264.7.

Apesar das atividades já descritas para o composto CI, sua possível atividade antitumoral em modelos *in vivo* ainda não foi explorada. Além dos resultados prévios já citados, esse polissacarídeo apresenta outras características promissoras e interessantes: a alta quantidade de sulfatos em um polissacarídeo, característica do CI, está associada a uma maior atividade biológica (Patel, 2012);

maiores quantidades de sulfato também estão associadas com atividades imunomoduladoras, assim como uma relativa massa molecular baixa e a composição monossacarídica de galactanas (Ferreira *et al.*, 2015); por fim, a alga verde *Codium isthmocladum* possui distribuição global, e outras espécies do gênero *Codium* possuem métodos de cultivo artificial já descritos (Hwang, Baek e Park, 2008; Oliveira-Carvalho *et al.*, 2012), logo a descrição de atividades antitumorais e o possível interesse no cultivo dessa espécie no litoral da costa brasileira poderia vir a fomentar uma nova atividade econômica na região.

Tendo em vista a necessidade da busca de novos tratamentos para o melanoma metastático, os promissores resultados *in vitro* encontrados empregando o polissacarídeo CI na linhagem B16-F10, sua similaridade estrutural com compostos que já demonstraram atividades antitumorais, suas particularidades - como o grau de sulfatação e menor massa molecular frente à maioria das galactanas já descritas - e o potencial de exploração e fomento do cultivo da alga na região norte da costa brasileira, o composto CI foi selecionado para a realização de estudos *in vivo* empregando modelos tumorais de melanoma no presente trabalho de doutorado.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Dado os resultados promissores *in vitro* previamente encontrados para a homogalactana sulfatada extraída da alga *Codium isthmocladum*, o presente trabalho de doutorado visa avaliar se este composto possui atividade antitumoral e antimetastática em modelos *in vivo*.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito do tratamento terapêutico *in vivo* com CI no modelo de tumor sólido induzido pela linhagem B16-F10;
- Avaliar o efeito do pré-tratamento *in vivo* com CI no modelo de metástase experimental induzido pela linhagem B16-F10;

- Avaliar possíveis efeitos adversos causados pelo tratamento *in vivo* com CI através de parâmetros fisiológicos, bioquímicos e do hemograma dos camundongos;
- Avaliar o efeito do pré-tratamento *in vivo* com CI no modelo de metástase experimental induzido pela linhagem MDA-MB-231;
- Avaliar o efeito do tratamento *in vitro* com CI em dinâmicas malignizadas da linhagem B16-F10;
- Avaliar o efeito imunomodulatório do tratamento *in vivo* com CI empregando imunofenotipagem e análise de atividades associadas a macrófagos e células NK.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Experimentos *in vivo* – certificados das Comissões de Ética no Uso de Animais (CEUA)

Os experimentos *in vivo* descritos no presente trabalho foram desenvolvidos em três instituições diferentes, e todos os procedimentos empregados foram aprovados pelas respectivas CEUAs de cada uma delas:

- Os ensaios realizados no Laboratório de Investigação de Polissacarídeos Sulfatados (LIPS), do Departamento de Biologia Celular, Universidade Federal do Paraná, foram aprovados pela CEUA-BIO sob o processo 23075.147773/2016-56, certificado Nº 1025;
- Os ensaios realizados em colaboração com o Professor Roger Chammas no Centro de Investigação Translacional em Oncologia, no Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP), São Paulo, Brasil, foram aprovados na CEUA do instituto sob o processo 049/17;
- Os experimentos desenvolvidos em colaboração com o Professor Robert J. Gillies, decorrente de estágio sanduíche PDSE/CAPES, nos laboratórios do Departamento de Imagem e Metabolismo do Câncer, no *H. Lee Moffitt Cancer Center & Research Institute*, Tampa, Flórida, Estados Unidos, foram aprovados na CEUA do instituto sob o processo R IS00003462.

4.2 Cultivo celular e animais

Para os experimentos realizados no LIPS/UFPR, a linhagem de melanoma murino B16-F10 foi comprada do Banco de Células do Rio de Janeiro (Rio de Janeiro, Brasil). As células foram cultivadas em garrafas de cultura de 25 e/ou 175 cm² (Sarstedt, Numbrecht, Cat. 833910, Alemanha) com meio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; Life Technologies, Cat. 12800-058, Bleiswijk, Netherlands), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB; Life Technologies, Cat. 12657029, Bleiswijk, Holanda), 0.25 µg/mL de penicilina e 0.25 µg/mL de estreptomicina (Sigma, Cat. P3539, Estados Unidos). A linhagem de macrófagos murinos RAW 264.7 foi adquirida no Banco de Células do Rio de Janeiro, cultivadas em DMEM *High Glucose* (Thermo Fisher, Cat. E15009, Waltham, Estados Unidos) em garrafas de cultura de 25 cm² (Sarstedt), suplementado com 20% de SFB (previamente inativado por 1h a 57°C) e 0.25 µg/mL de penicilina e 0.25 µg/mL de estreptomicina. Ambas as linhagens foram mantidas em incubadora de CO₂ umidificada (Panasonic, Modelo MCO-170AICUVL-PA), a 37°C. Os animais utilizados foram camundongos isogênicos da linhagem C57Bl/6, fêmeas ou machos (como especificado posteriormente em cada experimento) com idades entre 8 e 12 semanas, com idades semelhantes entre si e peso médio de 25g, provenientes do biotério do Instituto Carlos Chagas, Curitiba, Paraná, Brasil. Os animais foram mantidos no Biotério do Setor de Ciências Biológicas, UFPR, e os experimentos foram conduzidos no LIPS/UFPR.

Para os experimentos realizados no ICESP a linhagem de melanoma murino B16-F10 foi comprada do Banco de Células do Rio de Janeiro (Rio de Janeiro, Brasil). As células foram cultivadas em garrafas de cultura de 25 e/ou 175 cm² (Corning, Cat. CLS430372, Estados Unidos) com meio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; Life Technologies, Cat. 12800-058, Holanda), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB; Life Technologies, Cat. 12657029, Holanda), 0.25 µg/mL de penicilina e 0.25 µg/mL de estreptomicina (Sigma, Cat. P3539, Estados Unidos). Os animais utilizados foram camundongos isogênicos da linhagem C57Bl/6, machos com idades entre 8 e 12 semanas, com idades semelhantes entre si e peso médio de 25g, provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Os animais foram mantidos no Centro de Medicina Nuclear, São Paulo, onde também foram conduzidos os experimentos.

Para os experimentos realizados no Moffitt empregando o modelo de metástase experimental de melanoma murino foi empregada a linhagem B16-F10-luc-G5 (transfectada para expressão estável do gene da luciferase expresso a partir do promotor SV40) adquirida do banco de células da empresa Caliper LifeSciences (Hopkinton, Estados Unidos). As células foram cultivadas em garrafas de cultura de 25 e/ou 175 cm² (Corning, Cat. CLS430372, Estados Unidos) com DMEM/F-12 (Gibco, Cat. 11320-033, Estados Unidos), suplementado com 5% de soro fetal bovino (Life Technologies, Cat. 12657029, Holanda) e 1% de penicilina e estreptomicina (Sigma, Cat. P3539, Estados Unidos). As células foram mantidas em incubadora de CO₂ umidificada, a 37°C. Os animais utilizados foram camundongos isogênicos da linhagem C57Bl/6, fêmeas com idades entre 8 e 12 semanas, com idades semelhantes entre si e peso médio de 25g, provenientes do biotério do Moffitt *Cancer Center*, local onde também foram conduzidos os experimentos.

Para os experimentos realizados no Moffitt empregando o modelo de metástase experimental de câncer de mama, a linhagem humana MDA-MB-231-luc (transfectada para expressão estável do gene da luciferase) foi adquirida do banco de células ATCC. As células foram cultivadas em garrafas de cultura de 25 e/ou 175 cm² (Corning, Cat. CLS430372, Estados Unidos) com meio DMEM-*High Glucose* (Gibco, Cat. 11965-090, Estados Unidos) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB; Life Technologies, Cat. 12657029, Holanda), 1% de penicilina e estreptomicina (Sigma, Cat. P3539, Estados Unidos). As células foram mantidas em incubadora de CO₂ umidificada, a 37°C. Os animais utilizados foram camundongos isogênicos da linhagem NOD *scid* gamma (NSG), fêmeas com idades entre 8 e 12 semanas, com idades semelhantes entre si e peso médio de 25g, provenientes do biotério do Moffitt *Cancer Center*, local onde também foram conduzidos os experimentos.

4.3 Obtenção, caracterização e solubilização do polissacarídeo em estudo

O polissacarídeo foi obtido da alga verde marinha *Codium isthmocladum*, tendo sido extraído, caracterizado e gentilmente cedido pelo grupo científico do Professor Dr. Hugo Alexandre Oliveira Rocha, do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN). As espécimes de *Codium isthmocladum* foram coletadas no litoral de Natal, Rio Grande do Norte, Brasil, e seu

uso para pesquisa foi aprovado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen), sob o protocolo A8C31A3. Esse composto foi previamente caracterizado por Farias e colaboradores (2008), como sendo uma galactana sulfatada, com monômeros de β -D-galactopiranosil 3 ligado 4 sulfatado, com massa molecular média de 14 kDa (Farias *et al.*, 2008). Para facilitação da identificação, o polissacarídeo empregado neste trabalho será denominado a partir de agora como “CI”. A comprovação da caracterização do composto foi repetida pelo grupo do Professor Dr. Hugo Alexandre antes do envio das amostras para nosso laboratório na UFPR.

A identificação de possível contaminação com lipopolissacarídeos (LPS) foi realizada como descrito por Santana-Filho e colaboradores (2012). O composto CI foi dissolvido em metanol, sendo então realizada a metanólise pela adição de ácido clorídrico em metanol 3M (MeOH-HCl). A amostra foi vortexada e mantida em estufa a 80°C por 20h. A solução foi então particionada em hexano e água dionizada. A fase de hexano foi evaporada e acetilada com piridina e anidrido acético a 100°C por 1h. Diluições seriadas de LPS (Sigma, Cat. L4391, Estados Unidos) foram usadas como padrão. As amostras foram analisadas por GC-MS (Santana-Filho *et al.*, 2012).

Para a realização dos experimentos *in vitro*, CI foi dissolvido na concentração necessária, como indicado posteriormente em cada ensaio, em DMEM sem SFB, seguido de incubação em Banho-Maria a 37°C por 30 minutos, vortexado por 5 minutos e esterilizado em filtro de seringa com membrana de 0.22 μ m (Millex, Cat. SLGV033RS, Estados Unidos). DMEM sem SFB foi utilizado como controle, sendo adicionado no mesmo volume do polissacarídeo.

Para os ensaios *in vivo* o polissacarídeo CI foi dissolvido em solução salina tamponada com fosfato (PBS) estéril, em pH 7.2. A quantidade necessária de composto foi pesada empregando espátulas previamente esterilizados por autoclavação, e o conteúdo foi colocado em placas de pétri estéreis de 60 mm (Corning, Cat. 430166, Estados Unidos) as quais foram destampadas dentro de uma cabine de fluxo laminar. A quantidade necessária de PBS foi adicionada nas placas, e a solução foi homogeneizada empregando pipeta sorológica estéril. Durante 2h esta solução permaneceu dentro do fluxo laminar com a lâmpada ultravioleta ligada. A cada 30 minutos a solução era novamente homogeneizada. Após este período, o conteúdo foi passado para tubos de 50 mL estéreis contendo barras magnéticas

previamente esterilizadas, sendo mantido overnight em agitação a 37°C. Animais controle receberam PBS com o mesmo volume inoculado de polissacarídeo nos animais tratados.

4.4 Modelo de tumor sólido – determinação de dose e repetições experimentais

O modelo de tumor sólido empregando a linhagem de melanoma murino B16-F10 foi realizado como descrito em (Overwijk e Restifo, 2001), com modificações – descritas abaixo - previamente testadas e adaptadas em nosso grupo de pesquisa.

Células da linhagem B16-F10 foram cultivadas em garrafas grandes (175 cm²) de cultivo celular até atingirem de 70 a 80% de confluência. Para a desadesão e contagem de células, o meio de cultura foi removido das garrafas, seguido da lavagem por duas vezes da superfície de cultivo para remoção de SFB utilizando 5 mL de PBS pré-aquecido a 37°C. Tripsina-EDTA (Gibco, Cat. 59418C, Estados Unidos) diluída 10x em PBS foi adicionada (5 mL), e as células foram mantidas em incubadora de CO₂ por 5 minutos. As garrafas foram novamente lavadas com DMEM com 10% de SFB para coleta das células desaderidas e inativação da tripsina, e o conteúdo foi transferido para tubos cônicos estéreis para centrifugação por 5 minutos a 1800 RPM. O *pellet* de células foi ressuspendido em PBS gelado, a fim de manter a viabilidade celular, e o processo de centrifugação foi realizado novamente. Uma alíquota das células foi coletada e misturada na proporção 1:1 com Azul de Tripán (Gibco, Cat. 313173, Estados Unidos) para contagem diferencial de viabilidade em Câmara de Neubauer. Os experimentos apenas tiveram prosseguimento quando a viabilidade celular foi maior do que 90%. Uma suspensão de células na concentração de 50×10^5 células/mL foi preparada, e um volume de 100 µL por animal foi inoculado (resultando em 5×10^5 células inoculadas por camundongo).

Após a contenção dos animais, com o auxílio de uma pinça, uma pequena área de pele da região superior do flanco direito dos camundongos foi levantada, e utilizando uma seringa de insulina de calibre 30G (BD, Cat. 328322, Estados Unidos), 100 µL da suspensão de células foi inoculada de forma controlada, garantindo a formação de uma “bolha”. A região de inoculação havia sido previamente depilada no dia anterior empregando uma navalha, permitindo a

visualização da pele e posterior medida de volume dos tumores. O peso dos animais foi aferido no dia anterior ao início dos experimentos.

O dia de inoculação é denotado como “Dia 0”. Cinco dias após a inoculação (“Dia 5”), animais que apresentavam tumores palpáveis ou visíveis passaram a ser tratados diariamente por 10 dias com o polissacarídeo CI ou PBS por via intraperitoneal (I.P.). O volume tumoral foi diariamente calculado através das dimensões dos tumores, as quais foram medidas com o uso de um paquímetro digital e utilizadas na fórmula modificada de um elipsoide “ $d \times d \times D \times 0.52$ ”, onde “d” é a dimensão menor e “D” é a dimensão maior. Ao final dos experimentos (“Dia 15”), os animais foram novamente pesados e então anestesiados com Cetamina (100 mg/Kg; Syntec) e Xilazina (10 mg/Kg; Syntec), inoculadas de forma I.P.. Após a perda de resposta a estímulos, os camundongos foram eutanasiados por deslocamento cervical. Diferentes órgãos foram coletados e pesados.

4.4.1 Determinação de dose

O primeiro experimento empregando o modelo de tumor sólido teve como objetivo determinar a dose de polissacarídeo a ser empregada nos próximos ensaios *in vivo*.

Para a realização deste ensaio as doses testadas de polissacarídeo foram de 50 e 100 mg/Kg. Como descrito no tópico 4.4, camundongos machos C57BL/6 previamente depilados na região do flanco superior direito foram inoculados com 5×10^5 células B16-F10 (Dia 0), e cinco dias após a inoculação (Dia 5) passaram a receber inoculações diárias por via I.P. do polissacarídeo nas diferentes doses ou de PBS (grupo controle) até o final do experimento (Dia 15). A fim de obter a total solubilização de todas as doses testadas e padronização do volume inoculado, o volume final de inoculação diária em cada camundongo foi de 1 mL por dose, sendo que igual volume de PBS foi inoculado diariamente nos camundongos controle. O grupo controle foi realizado com um N amostral de 6 camundongos; os grupos das doses de polissacarídeo foram realizados com um N amostral de 5 camundongos por dose.

4.4.2 Repetição experimental com a dose determinada (50 mg/Kg)

Após a determinação da dose de 50 mg/Kg para os demais ensaios *in vivo*, o experimento empregando o modelo de tumor sólido foi repetido de forma biologicamente independente para comprovar a atividade antitumoral do composto.

Para as repetições experimentais, os mesmos procedimentos gerais descritos no item 4.4 para cultivo celular e modelo tumoral foram seguidos. Três ensaios biologicamente independentes foram realizados:

- Em um experimento realizado no ICESP com camundongos C57BL/6 machos provenientes do CMN/SP, adotou-se para o grupo controle um N amostral de 6, os quais receberam inoculações diárias por 10 dias via I.P. de 1 mL de PBS, tendo início cinco dias após a inoculação celular; para o grupo tratado com CI a 50 mg/Kg, o N amostral de 7, os quais receberam inoculações diárias por 10 dias via I.P. de 1 mL de polissacarídeo, tendo início cinco dias após a inoculação celular; a fim de verificar a atividade conjunta do polissacarídeo com o quimioterápico Dacarbazina (Dtic), um grupo de camundongos com N amostral de 7 foi tratado no mesmo regime de tratamento previamente descrito com 80 mg/Kg do quimioterápico; e um quarto grupo com N amostral de 7 e mesmo regime de tratamento recebeu doses diárias de CI a 50 mg/Kg e Dtic a 80 mg/Kg; o composto Dtic não foi mais empregado nos experimentos subsequentes;
- Em outro experimento realizado no ICESP com camundongos C57BL/6 machos provenientes do CMN/SP, adotou-se para o grupo controle um N amostral de 7, os quais receberam inoculações diárias por 10 dias via I.P. de 1 mL de PBS, tendo início cinco dias após a inoculação celular; para o grupo tratado com CI a 50 mg/Kg, o N amostral de 7, os quais receberam inoculações diárias por 10 dias via I.P. de 1 mL de polissacarídeo, tendo início cinco dias após a inoculação celular;
- Em um experimento realizado no LIPS/UFPR com camundongos C57BL/6 machos provenientes do ICC/PR, adotou-se para o grupo controle um N amostral de 9, os quais receberam inoculações diárias por 10 dias via I.P. de 1 mL de PBS, tendo início cinco dias após a inoculação celular; para o grupo tratado com CI a 50 mg/Kg, o N amostral de 9, os quais receberam inoculações diárias por 10 dias via I.P. de 1 mL de polissacarídeo, tendo início cinco dias após a inoculação celular.

4.5 Modelo de metástase experimental

O modelo de metástase experimental empregando as linhagens de melanoma murino B16-F10 e B16-F10-luc-G5 e a linhagem de câncer de mama humano MDA-MB-231-luc foram realizados como descrito em (Overwijk e Restifo, 2001), com modificações – descritas abaixo - previamente testadas e adaptadas e em decorrência do desenho experimental realizado.

Células B16-F10, B16-F10-luc-G5 ou MDA-MB-231 foram cultivadas em garrafas grandes (175 cm²) de cultivo celular até atingirem de 70 a 80% de confluência. Para a desadesão e contagem de células, o meio de cultura foi removido das garrafas, seguido da lavagem por duas vezes da superfície de cultivo para remoção de SFB utilizando 5 mL de PBS pré-aquecido a 37°C. Tripsina-EDTA (Gibco, Cat. 59418C, Estados Unidos) diluída 10x em PBS foi adicionada (5 mL), e as células foram mantidas em incubadora de CO₂ por 5 minutos. As garrafas foram novamente lavadas com DMEM com 10% de SFB para coleta das células desaderidas e inativação da tripsina, e o conteúdo foi transferido para tubos cônicos estéreis para centrifugação por 5 minutos a 1800 RPM. O *pellet* de células foi ressuspenso em PBS gelado, a fim de manter a viabilidade celular, e o processo de centrifugação foi realizado novamente. Uma alíquota das células foi coletada e misturada na proporção 1:1 com Azul de Tripán (Gibco, Cat. 313173, Estados Unidos) para contagem diferencial de viabilidade em Câmara de Neubauer. Os experimentos apenas tiveram prosseguimento quando a viabilidade celular foi maior do que 90%. Uma suspensão de células na concentração de 5x10⁵ células/mL foi preparada com as linhagens B16-F10 e B16-F10-luc-G5, e um volume de 100 µL por animal foi inoculado (resultando em 5x10⁵ células inoculadas por camundongo). Para a linhagem MDA-MB-231-luc, uma suspensão de células na concentração de 10x10⁶ células/mL foi preparada, e um volume de 100 µL por animal foi inoculado (resultando em 1x10⁶ células inoculadas por camundongo).

Após a contenção dos camundongos C57BL/6 (para as linhagens B16-F10 e B16-F10-luc-G5) e dos camundongos NSG (para a linhagem MDA-MB-231-luc), as veias caudais foram dilatadas por aquecimento da cauda dos animais em água a 37°C, e utilizando seringa de insulina de calibre 30G (BD, Cat. 328322, Estados

Unidos), 100 µL da suspensão de células foi inoculada de forma controlada em uma das veias laterais.

Todos os experimentos empregando o modelo de metástase experimental foram realizados com pré-tratamento com CI de 24h antes da inoculação celular. Desta forma, o “Dia 0” é o primeiro dia de tratamento com o composto CI ou PBS (grupo controle). O “Dia 1” é o dia da inoculação celular. A partir deste dia, seguiu-se com administração diária do polissacarídeo ou PBS até a finalização dos experimentos.

4.5.1 Metástase experimental – finalização após 21 dias de inoculação das células (linhagem B16-F10)

Empregando os procedimentos de cultivo celular e inoculação descritos no item 4.5, o modelo de metástase experimental com a linhagem B16-F10 foi realizado com tempo de progressão de 21 dias após a inoculação celular, buscando avaliar o efeito prolongado do tratamento na progressão tumoral. Camundongos C57BL/6 fêmeas foram pré-tratados com CI a 50 mg/Kg ou PBS (Dia 0), e 24h após o tratamento foram inoculados com 5×10^5 células na veia caudal lateral (Dia 1). Os animais continuaram a serem tratados diariamente com CI ou PBS por mais 21 dias após a inoculação celular até a finalização do experimento (Dia 22). Como descrito no item 4.4, os camundongos foram anestesiados e eutanasiados via deslocamento cervical, seguido de coleta e pesagem dos pulmões, rins, fígado e baço. O sangue dos animais foi coletado para análise de parâmetros bioquímicos e hemograma, como descrito no item 4.6. Imagens das vistas ventral e dorsal dos pulmões foram capturadas e analisadas empregando o software Fiji ImageJ (Schindelin *et al.*, 2012) para quantificação de áreas colonizadas (tumores primários nos pulmões resultado do modelo de metástase experimental). O valor de área metastática corresponde a uma razão entre a soma das áreas ventral e dorsal totais dos pulmões dividido pela soma das áreas ventral e dorsal colonizadas por metástase, transformada em porcentagem. O N amostral dos grupos CI e controle foi de 10 e 12 animais respectivamente.

Os tecidos coletados neste experimento foram fixados em formalina 10% por 24h, sendo então preservados em álcool 70%. O lóbulo direito dos pulmões foram processados para histologia.

Para o processamento histológico, os lóbulos dos pulmões foram desidratados em bateria alcoólica crescente (70, 80, 90, 95 e 100%), permanecendo 1h30 em cada solução. Após a desidratação, o material foi diafanizado por incubações sequencias em soluções de Álcool 100% : Xilol (1h), Xilol (40 min) e Xilol (15 min). Após a diafanização, o material foi incluído em Parafina (Merck, Cat. 11609, Estados Unidos) por 6h. Cortes de 6 μ M foram obtidos de cada bloco empregando o micrótomo (Leica RM2155).

O material obtido no processamento histológico foi então corado com Hematoxilina e Eosina. Para esta coloração, o material foi inicialmente desparafinizado por incubações sequencias nas soluções: Xilol (5 min), Xilol (3 min), Álcool 100% : Xilol (3 min), Álcool 100% (3 min), Álcool 100% (3min), Álcool 95% (3 min), Álcool 90% (3 min); Álcool 80% (3 min) e Álcool 70% (3 min). O material foi então lavado em água corrente por 10 min, e então corado com Hematoxilina (EMS, Cat. 2604310, Estados Unidos) por 30 segundos, lavado em água corrente por 10 min, corado com Eosina (Merck, Cat. E4009, estados Unidos) por 30 segundos e rapidamente lavado com água destilada. Após a coloração, o material foi desidratado por incubações sequenciais em álcool, como descrito anteriormente. As lâminas foram então montadas de forma permanente com o uso do meio de montagem Entellan (Merck, Cat. 107960, Estados Unidos). A obtenção das imagens foi feita utilizando o scanner de lâminas VSlide (Carl ZEISS and Metasystems). Toda a área do corte foi escaneada com a objetiva de 20x.

4.5.2 Metástase experimental – acompanhamento via IVIS (linhagem B16-F10-luc-G5)

Empregando os procedimentos de cultivo celular e inoculação descritos no item 4.5, o modelo de metástase experimental com a linhagem B16-F10-luc-G5 foi realizado e acompanhado empregando o Sistema de Imageamento *In Vivo* (IVIS). Camundongos C57BL/6 fêmeas e machos foram pré-tratados com CI a 50 mg/Kg ou PBS (Dia 0), e 24h após o tratamento foram inoculados com 5×10^5 células B16-F10-luc-G5 na veia caudal lateral (Dia 1). Os animais continuaram a ser tratados diariamente com CI ou PBS por mais 15 dias após a inoculação celular até a finalização do experimento (Dia 16). O N amostral de cada grupo foi de 5 (grupos controle fêmeas, controle machos, CI fêmeas e CI machos).

O acompanhamento da progressão metastática via IVIS teve início 2h após a inoculação celular (Dia 1). Para isso, 1h 45 min após a inoculação das células os camundongos foram inoculados via I.P com luciferina *XenoLight D-luciferin* (PerkinElmer, Cat. 122799, Estados Unidos) na concentração de 150 µg/mL diluída em DMEM sem SFB com um volume igual a 10x o peso do animal, sendo então posicionados no equipamento Xenogen IVIS 200 (Xenogen Corporation, Hopkinton, Estados Unidos) e mantidos anestesiados via inalação contínua de isofluorano. A luciferase expressa pelas células tumorais realiza a quebra da luciferina inoculada, gerando um pico de bioluminescência entre 5 e 10 minutos após a inoculação, a qual é capturada pela câmera gerando valores de radiância (fótons/segundo/cm²/sr) proporcionais à quantidade de células tumorais presentes no tecido. Todas as imagens foram realizadas com o mesmo tempo de captura de bioluminescência. O mesmo procedimento foi realizado 9 dias após a inoculação celular (Dia 10).

Ao final do experimento (Dia 16), os camundongos foram eutanasiados em câmara de CO₂. Pulmões, rins, fígado, baço e pâncreas foram coletados e pesados, sendo então posicionados em placas de pétri de 60 mm (Corning, Cat. 430166, Estados Unidos) e cobertos com 4 mL de uma solução de luciferina a 150 µg/mL diluída em DMEM sem SFB para a realização de captura de bioluminescência *ex vivo*.

4.5.3 Metástase experimental – finalização após 9 dias de inoculação das células (linhagem B16-F10)

Empregando os procedimentos de cultivo celular e inoculação descritos no item 4.5, o modelo de metástase experimental com a linhagem B16-F10 foi realizado com tempo de progressão de 9 dias após a inoculação celular. Camundongos C57BL/6 fêmeas foram pré-tratados com CI a 50 mg/Kg ou PBS (Dia 0), e 24h após o tratamento foram inoculados com 5x10⁵ células na veia caudal lateral (Dia 1). Os animais continuaram a ser tratados diariamente com CI ou PBS por mais 9 dias após a inoculação celular até a finalização do experimento (Dia 10). Como descrito no item 4.4, os camundongos foram anestesiados e eutanasiados via deslocamento cervical, seguido de coleta e pesagem dos pulmões, rins, fígado e baço. O sangue dos animais foi coletado para análise de parâmetros bioquímicos, como descrito no item 4.6. Imagens das vistas ventral e dorsal dos pulmões foram realizadas para contagem de focos metastáticos (tumores primários nos pulmões resultado do

modelo de metástase experimental). O N amostral dos grupos CI e controle foi de 5 animais por grupo. O mesmo procedimento experimental com o mesmo N amostral foi repetido e finalizado após 3 dias de inoculação da linhagem B16-F10 (portanto 96h de tratamento com CI). Este ensaio não apresentou focos metastáticos nos pulmões dos animais, não sendo mostrado nos resultados. Porém os órgãos e sangue dos camundongos foram coletados e utilizados para análise de possíveis efeitos colaterais (Item 4.6) e para análise de citocinas do soro (Item 4.18).

4.5.4 Metástase experimental – acompanhamento via IVIS (linhagem MDA-MB-231)

Empregando a metodologia descrita no item 4.5.2, o ensaio de metástase experimental com acompanhamento da progressão via IVIS foi realizado empregando a linhagem MDA-MB-231-luc.

Camundongos NSG fêmeas foram pré-tratados com CI a 50 mg/Kg ou PBS (Dia 0), e 24h após o tratamento foram inoculados com 1×10^6 células MDA-MB-231-luc na veia caudal lateral (Dia 1). Os animais continuaram a ser tratados diariamente com CI ou PBS por mais 27 dias após a inoculação celular até a finalização do experimento (Dia 28). O N amostral de cada grupo foi de 10 (grupos controle e CI fêmeas).

A captura de imagens via IVIS foi realizada 2h após a inoculação celular, e então no 10º, 17º, 21º, 24º e 27º dias de experimento. Ao final do ensaio (28º dia) a captura de bioluminescência *ex vivo* dos pulmões, rins, fígado, pâncreas e baço dos animais foi realizada.

4.6 Avaliação de efeitos colaterais – parâmetros bioquímicos, hemograma e variação de peso

Possíveis efeitos colaterais resultantes do polissacarídeo CI nos experimentos *in vivo* foram avaliados após diferentes períodos de tratamento com o composto:

- Após 4, 10 e 21 dias de tratamento diário com CI a 50 mg/Kg ou PBS nos experimentos empregando o modelo de metástase experimental (Itens 4.5.1 e 4.5.2, respectivamente), o sangue dos camundongos foi coletado pela veia cava e transferido para *vacutainers* contendo EDTA (BD Biosciences, Cat. 367838, Estados Unidos). No experimento de 4 dias de tratamento, foram obtidos valores de aspartato aminotransferase, creatinina e gama GT; no

experimento de 10 dias de tratamento, foram obtidos os valores de fosfatase alcalina, creatinina e gama GT; no experimento de 21 dias de tratamento, foram obtidos os valores de alanina aminotransferase, aspartato aminotransferase, creatinina, ureia, colesterol total, triglicerídeos, lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL) e procalcitonina, além de hemograma; nos três ensaios foram analisados os valores de variação de peso corporal e do peso dos órgãos coletados;

- Após 7 e 14 dias de tratamento diário com CI a 50 mg/Kg ou PBS em camundongos C57BL/6 (N amostral igual a 3 para cada grupo) que não foram inoculados com células tumorais o sangue dos camundongos foi coletado pela veia cava e transferido para *vacutainers* contendo EDTA (BD Biosciences, Cat. 367838, Estados Unidos). Em ambos os ensaios foram obtidos valores do hemograma e variação de peso dos órgãos coletados. No experimento com regime de tratamento de 7 dias também foram obtidos os valores de ureia nitrogenada, fosfato, bilirrubina, amilase e procalcitonina.

O hemograma e as análises bioquímicas do sangue foram feitas em colaboração com o Hospital Veterinário da UFPR, empregando o analisador químico clínico Mindray BS-200 (Mindray, China) de acordo com as instruções do fabricante. O peso dos órgãos é demonstrado em porcentagem, resultante da proporção do peso do referido órgãos em relação ao peso do animal.

4.7 Cultivo celular – experimentos *in vitro* com a linhagem B16-F10

Células da linhagem de melanoma murino B16-F10 foram cultivadas em garrafas de cultura de 25 e/ou 175 cm² (Sarstedt, Cat. 833910, Alemanha) com meio de cultivo DMEM (Life Technologies, Cat. 12800-058, Bleiswijk, Netherlands), suplementado com 10% de SFB (Life Technologies, Cat. 12657029, Bleiswijk, Holanda), 0.25 µg/mL de penicilina e 0.25 µg/mL de estreptomicina (Sigma, Cat. P3539, Estados Unidos) e mantidas em incubadora de CO₂ umidificada (Panasonic, Modelo MCO-170AICUVL-PA), a 37°C. Para o plaqueamento dos experimentos realizou-se a desadesão e contagem de células: o meio de cultura foi removido das garrafas, seguido da lavagem por duas vezes da superfície de cultivo para remoção de SFB utilizando 5 mL de PBS pré-aquecido a 37°C. Tripsina-EDTA (Gibco, Cat. 59418C, Estados Unidos) diluída 10x em PBS foi adicionada (1 mL para garrafas

pequenas, 5 mL para garrafas grandes), e as células foram mantidas em incubadora de CO₂ por 5 minutos. As garrafas foram novamente lavadas com DMEM com 10% de SFB para coleta das células desaderidas e inativação da tripsina, e o conteúdo foi transferido para tubos cônicos estéreis para centrifugação por 5 minutos a 1800 RPM. O *pellet* de células foi ressuscitado em DMEM com 10% de SFB e as células foram contadas em Câmara de Neubauer, procedendo-se para o plaqueamento com número de células e superfície de cultivo de acordo com o design experimental utilizado.

4.8 Adesão celular – linhagem B16-F10

O ensaio de adesão celular foi feito como descrito em (Khalili e Ahmad, 2015) com modificações. Células da linhagem B16-F10 (1.2×10^4 células/poço) foram plaqueadas em placas de seis poços (Sarstedt, Cat. 833920300, Alemanha) e após 24h expostas ao polissacarídeo CI ou não (grupo controle) na concentração de 100 µg/mL por 72h. Após o período de tratamento as células foram desaderidas por 5 minutos com EDTA 2 mM (EMS, Cat. TC0301, Estados Unidos), contadas em câmara de Neubauer e plaqueadas nos poços das placas de 96 poços previamente sensibilizados (como descrito abaixo), por um período de adesão de 2h30. Após esse período, células não aderentes foram removidas através de lavagem com PBS. As células que permaneceram aderidas foram fixadas por 20 minutos com uma solução de Etanol:Ácido acético glacial:Água (50:49:1) e coradas com Cristal Violeta 0.2% (Sigma, Cat. C0775, Estados Unidos) em etanol por 10 minutos. O corante foi eluído com uma solução de ácido acético glacial 33% em água destilada, procedendo-se então para leitura de absorbância dos poços em leitora de microplacas em 570 nm (Biotek Epoch, Estados Unidos).

Para a realização do ensaio, placas de 96 poços (Sarstedt, Cat. 833924, Alemanha) foram previamente sensibilizadas com moléculas de MEC. Para a sensibilização das placas foi empregado Matrigel (Corning, Cat. 354248, Estados Unidos), colágeno I (Thermo Fisher, Cat. A1064401, Estados Unidos) fibronectina (BD, Cat. 354008, Estados Unidos), todas na concentração de 20 µg/mL, pipetadas em volume de 50 µL por poço 24h antes do final do período de tratamento das células com o polissacarídeo. A placa contendo essas moléculas foi mantida overnight a 4°C, sendo então lavada 1x com PBS para realização do ensaio. Em

outra abordagem experimental, placas pré-sensibilizadas como descrito acima foram incubadas, em incubadora de CO₂, com 50 µL de uma solução a 100 µg/mL de CI por 24h, e poços utilizados como controle foram incubados com o mesmo volume de DMEM sem SFB. Após esse período, o conteúdo dos poços foi removido e esses foram lavados 1 vez com 100 µL de PBS. Seguindo o protocolo experimental acima descrito, células B16-F10 foram desaderidas e plaqueadas nesses poços, onde puderam aderir por 2h30, sendo então lavadas para remoção de células não aderentes e coradas com CV para posterior leitura de absorbância. As células utilizadas nesta abordagem não haviam sido previamente tratadas com o composto. Desta forma, este ensaio buscou avaliar a possível interação direta entre o polissacarídeo e as moléculas de matriz.

Ambas as abordagens experimentais foram realizadas em quadruplicata biológica, com um mínimo de triplicata técnica em cada ensaio.

4.9 Invasão celular – linhagem B16-F10

Células da linhagem B16-F10 (2×10^3 células/poço) foram plaqueadas em placas de 24 poços (Sarstedt, Cat. 833922500, Alemanha) e após 24h expostas ao polissacarídeo CI ou não (grupo controle) na concentração de 100 µg/mL por 72h. Após o período de tratamento as células foram desaderidas por 5 minutos com EDTA 2 mM (EMS, Cat. TC0301, Estados Unidos), contadas em câmara de Neubauer e plaqueadas na região interna de transwells com poros de 8 µm (Millipore, Cat. MCEP24H48, Estados Unidos) previamente cobertos com 35 µL de Matrigel (Corning, Cat. 354248, Estados Unidos) diluído em DMEM sem SFB, na concentração de 3 mg/mL. Como quimioatratante, o poço contendo os transwells foi preenchido com 500 µL de DMEM com 10% de SFB. Após 72h de invasão, os transwells foram lavados com PBS e fixados por 1h com paraformaldeído a 2% (EMS, Cat. 30525-89-4, Estados Unidos), em volume de 200 µL na parte externa do inserto e 150 µL na parte interna. Após a fixação, os transwells foram novamente lavados com PBS e incubados por 30 minutos com *ActinGreen Ready Probes* diluído 1:40 (Invitrogen, Cat. R37109, Estados Unidos). Usando cotonetes úmidos, as células que não invadiram (porção interna dos transwells) foram removidas. A membrana de cada inserto foi então cuidadosamente cortada com um bisturi e montada em lâminas de microscopia utilizando o meio de montagem Fluormount G

com DAPI (EMS, Cat. 17984-24, Estados Unidos). Utilizando o scanner de lâminas VSlide (Carl ZEISS and Metasystems), toda a área de cada membrana foi capturada usando a objetiva de 20x. O número de células que invadiram foi contado através da marcação nuclear com DAPI, empregando o programa Fiji ImageJ (Schindelin *et al.*, 2012). O experimento foi realizado em triplicata biológica e duplicata técnica em cada ensaio.

4.10 Marcação de glicoconjugados

Células da linhagem B16-F10 (1.2×10^4 células/poço) foram plaqueadas em placas de seis poços (Sarstedt, Cat. 833920300, Alemanha) e após 24h expostas ao polissacarídeo CI ou não (grupo controle) na concentração de 100 µg/mL por 72h. Após esse período as células foram desaderias com tripsina (Gibco, Cat. 59418C, Estados Unidos), centrifugadas a 1800 RPM por 3 minutos e então incubadas por 30 minutos em 50 µL de PBS contendo 1 µL de lectina WGA conjugada com Alexa Fluor 488 (Invitrogen, Cat. W11261, Estados Unidos), a qual liga-se especificamente a N-acetilglucosamina e ácido N-acetilneuraminico (sendo ácido siálico o membro mais comum deste grupo). Após o período de incubação, as células foram novamente centrifugadas e ressuspensas em PBS para análise por citometria de fluxo. As amostras foram adquiridas usando o citômetro BD FACSVerse (BD, Estados Unidos), sendo que 10000 eventos foram analisados por amostra, e analisadas empregando o software FlowJo (FlowJo, Estados Unidos). O experimento foi realizado em triplicata biológica.

4.11 Imunofenotipagem do baço – camundongos C57BL/6

Camundongos C57BL/6 fêmeas foram tratados diariamente por 10 dias com o polissacarídeo CI a 50 mg/mL ou PBS (grupo controle) por via I.P.. Ao final do tratamento, os camundongos foram eutanasiados em câmara de CO₂ para pesagem e processamento do baço para imunofenotipagem empregando citometria de fluxo.

Após a coleta os baços dos camundongos foram mantidos em meio DMEM/F-12 a 4°C contendo 1% de SFB e então macerados com o auxílio do êmbolo de seringas. O conteúdo foi então filtrado empregando *cell strainers* de membrana de 70 µm (Corning, Cat. 431751, Estados Unidos). O conteúdo filtrado foi centrifugado a 1500 RPM por 5 minutos a 4°C. O pellet formado foi ressuspendido em 10 mL de

Red Blood Cells lysis buffer (Sigma, Cat. 11814389001, Estados Unidos), vortexado por 5 segundos e incubado a temperatura ambiente por 10 minutos. Após este período, 10 mL de meio de cultura DMEM/F-12 foi adicionado, seguido de nova centrifugação a 1500 RPM por 5 minutos a 4°C. As marcações realizadas foram feitas com os seguintes anticorpos diluídos em PBS BSA 1% (anticorpo-fluoróforo): *rat anti-mouse* CD3-BV786 (BD, Cat. 564010), *rat anti-mouse* CD4-BV605 (BD, Cat. 63-0042-82), *rat anti-mouse* CD8a-BUV395 (BD, Cat. 565968), *rat anti-mouse* CD11b-Pe-Cy7 (BD, Cat. 561098), *rat anti-mouse* CD25-BV422 (BD, Cat. 566228), *rat anti-mouse* Ly-6G- FITC (BD, Cat. 561105), *rat anti-mouse* Ly-6C- PerCP Cy5.5 (BD, Cat. 560525), *zombie* NIR-APC-Cy7 *like* (Biolegend, Cat. 423105). As amostras foram então lavadas com PBS para então serem fixadas em paraformoldeído 2% por 30 minutos. A aquisição das amostras foi realizada no citômetro BD LSR II (BD, Estados Unidos), e a análise dos dados no software FlowJo (FlowJo, Estados Unidos). O N amostral de cada grupo foi de 5 animais por grupo.

4.12 Cultivo celular – experimentos *in vitro* com a linhagem RAW 264.7

Células da linhagem de macrófago murino RAW 264.7 foram cultivadas com DMEM *High Glucose* (Thermo Fisher, Cat. E15009, Estados Unidos) em garrafas de cultura de 25 cm² (Sarstedt, Cat. 833910, Alemanha), suplementado com 20% de SFB (previamente inativado por 1h a 57°C) e 0.25 µg/mL de penicilina e 0.25 µg/mL de estreptomicina (Sigma, Cat. P3539, Estados Unidos). Ambas as linhagens foram mantidas em incubadora de CO₂ umidificada (Panasonic, Modelo MCO-170AICUVL-PA), a 37°C. Para o plaqueamento dos experimentos realizou-se a desadesão e contagem de células: o meio de cultivo foi removido e substituído por meio novo, seguindo-se para desadesão das células utilizando um *cell scraper* (Sarstedt, Cat. 831830, Alemanha); o conteúdo das garrafas foi coletado e transferido para tubos cônicos estéreis para centrifugação por 5 minutos a 1800 RPM. O *pellet* de células foi ressuspenso em DMEM com 10% de SFB e as células foram contadas em Câmara de Neubauer, procedendo-se para o plaqueamento com número de células e superfície de cultivo de acordo com o design experimental utilizado.

4.13 Viabilidade celular pela redução do MTT – linhagem RAW 264.7

O método de MTT foi realizado com adaptações a partir do protocolo descrito por (Mosmann, 1983) e (Fotakis e Timbrell, 2006). Células da linhagem RAW 264.7 (1×10^4 células/poço) foram plaqueadas em placas de 96 poços (Sarstedt, Cat. 833924, Alemanha) e após 24h expostas ao polissacarídeo CI ou não (grupo controle) nas concentrações de 1, 10, 100 e 1000 $\mu\text{g/mL}$ por 72h. Três horas antes do final do período de tratamento as células foram incubadas com 15 μL de MTT a 5 mg/mL (Sigma, Cat. M5655, Estados Unidos) em 135 μL de meio. Ao final desse tempo, o conteúdo dos poços foi removido e os cristais de formazan formados no interior das células foram eluídos com 100 μL de dimetilsulfóxido (Merck, Cat. 67685, Estados Unidos), procedendo-se então para leitura de absorbância em leitor de microplacas (Biotek, Epoch) em comprimento de onda de 540 nm. O experimento foi realizado em quadruplicata biológica e quadruplicata técnica em cada ensaio.

4.14 Viabilidade celular pela retenção de Vermelho Neutro – linhagem RAW 264.7

O método de Vermelho Neutro (VN) foi realizado com adaptações a partir do protocolo descrito por (Borenfreund e Puerner, 1985). Células da linhagem RAW 264.7 (1×10^4 células/poço) foram plaqueadas em placas de 96 poços (Sarstedt, Cat. 833924, Alemanha) e após 24h expostas ao polissacarídeo CI ou não (grupo controle) nas concentrações de 1, 10, 100 e 1000 $\mu\text{g/mL}$ por 72h. Duas horas antes do final do período de tratamento as células foram incubadas com 15 μL de VN a 1.1 mg/mL (Sigma, Cat. 72210, Estados Unidos) em 135 μL de meio. Após esse tempo o conteúdo de VN retido pelos lisossomos das células foi eluído com uma solução de Etanol:Ácido Acético Glacial:Água (50:49:1), procedendo-se para leitura de absorbância em leitor de microplacas (Biotek, Epoch) em comprimento de onda de 550 nm. O experimento foi realizado em quadruplicata biológica e quadruplicata técnica em cada ensaio.

4.15 Densidade celular – linhagem RAW 264.7

O ensaio de densidade celular com Cristal Violeta (CV) foi feito com adaptações a partir do protocolo descrito por (Gillies, Didier e Denton, 1986). Células da linhagem RAW 264.7 (1×10^4 células/poço) foram plaqueadas em placas de 96 poços (Sarstedt, Cat. 833924, Alemanha) e após 24h expostas ao polissacarídeo CI

ou não (grupo controle) nas concentrações de 1, 10, 100 e 1000 µg/mL por 72h. Ao final do período as células foram fixadas com uma solução de Etanol:Ácido Acético Glacial:Água (50:49:1), e em seguida coradas por 10 minutos com 100 µL de CV 0.2% (EMS, Cat. 12785, Estados Unidos) diluído em 5% de Etanol. O conteúdo dos poços foi removido e lavado por 2x com água destilada, e o corante restante foi eluído com uma solução de Ácido Acético Glacial a 33% em água destilada, procedendo-se para leitura de absorbância em leitor de microplacas (Biotek, Epoch) em comprimento de onda de 570 nm. O experimento foi realizado em quadruplicata biológica e quadruplicata técnica em cada ensaio.

4.16 Fagocitose – linhagem RAW 264.7

Células da linhagem RAW 264.7 (4×10^4 células/poço) foram plaqueadas sobre lamínulas circulares de vidro (kasvi, Cat. K5-0013, Brasil) previamente posicionadas em placas de 24 poços (Sarstedt, Cat. 833922500, Alemanha). Após 24h foram expostas ao polissacarídeo CI ou não (grupo controle) na concentração de 100 µg/mL por 72h. Ao final do período de tratamento, 1×10^6 partículas de levedura previamente marcadas com FITC (como descrito abaixo) foram adicionadas aos poços. Após 2h as células foram então fixadas com paraformaldeído 2% diluído em PBS, procedendo-se para marcação do citoesqueleto de actina com ActinGreen (Thermo Fisher, Cat. R37110, Massachusetts, Estados Unidos) e do núcleo das células com DAPI (Invitrogen, Cat. D1306, Estados Unidos). Imagens de cinco campos representativos das lamínulas foram adquiridas na objetiva de 20x no microscópio confocal Nikon A1R MP+. Empregando o software Fiji ImageJ (Schindelin *et al.*, 2012) o número de células e partículas marcadas foi contado, e o resultado foi obtido pela divisão do número de partículas pelo número de células. O experimento foi realizado em duplicata biológica e duplicata técnica em cada ensaio.

Para a marcação prévia das leveduras com FITC, 2×10^8 partículas de levedura foram solubilizadas em PBS e incubadas em Banho-Maria a 57°C por 2h para inativação. Após esse período, adicionou-se FITC a 10 mg/mL (Sigma, Cat. F4274, Alemanha) diluído em dimetilsulfóxido a fim de obter uma concentração final de 0.5 mg/mL, e a solução foi incubada por 1h a temperatura ambiente, protegida da luz, em agitação leve. Após esse período as leveduras foram centrifugadas a 1800

RPM por 5 minutos e ressuspensas em PBS, processo o qual foi repetido 3 vezes. Essa solução foi mantida em congelador até o uso.

4.17 Perfil de citocinas – linhagem RAW 264.7

Citocinas presentes no sobrenadante de cultivo da linhagem RAW 264.7 foram analisadas empregando o kit CBA *Mouse Inflammation* (BD, Cat. 552364, Estados Unidos). As citocinas analisadas foram IL-6, IL-10, MCP-1, IFN- γ , TNF e IL-12p70.

Células da linhagem RAW 264.7 (1×10^4 células/poço) foram plaqueadas em placas de 96 poços (Sarstedt, Cat. 833924, Alemanha) e após 24h expostas ao polissacarídeo CI ou não (grupo controle) na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ por 24 ou 72h. Lipopolissacarídeo (LPS; Sigma, Cat. L2630, Estados Unidos) na concentração de 500 ng/mL foi adicionado 16h antes do término do experimento em poços que serviram como controle positivo, assim como em poços previamente tratados com o polissacarídeo CI, resultando nos grupos Controle, CI, LPS e CI+LPS. Ao final do período de tratamento, o sobrenadante de cada poço foi coletado em microtubos de centrifuga, e 50 μL de cada amostra foi utilizado para a análise. O procedimento experimental para quantificação foi realizado conforme orientações do fabricante do kit de CBA. As amostras foram adquiridas no citômetro de fluxo BD FACSVerse (BD, Estados Unidos), e o resultado analisado empregando o software FCAP Array (BD, Estados Unidos). Os experimentos foram realizados em duplicata biológica para a análise de 24h de tratamento e em triplicata biológica para a análise de 72h. Todos os ensaios foram realizados em duplicata técnica, e ao final do período de tratamento o sobrenadante dos poços de cada duplicata técnica foi coletado em um mesmo microtubo para análise.

4.18 Perfil de citocinas – *in vivo*

O perfil de citocinas resultantes da comunicação entre o sistema imune dos animais, células tumorais e o polissacarídeo CI foi analisado empregando o kit CBA *Mouse Inflammation* (BD, Cat. 552364, Estados Unidos). As citocinas analisadas foram IL-6, IL-10, MCP-1, IFN- γ , TNF e IL-12p70.

Camundongos fêmeas C57Bl/6 foram tratados com o polissacarídeo CI na dose de 50 mg/Kg ou com PBS por 24h, sendo então inoculados com células da

linhagem B16-F10 conforme descrito no item 4.5. Os camundongos continuaram a ser tratados diariamente, e após 24h e 72h da inoculação das células os animais foram anestesiados, tiveram o sangue coletado via punção cardíaca e foram eutanasiados. O sangue coletado foi centrifugado a 1800 RPM por 5 minutos, e o sobrenadante resultante da coagulação foi coletado e processado para quantificação de citocinas conforme orientações do fabricante do kit de CBA. As amostras foram adquiridas no citômetro de fluxo BD FACSVerse, e o resultado analisado empregando o software FACSArray (BD, Missouri, Estados Unidos). O N amostral de cada grupo e em cada tempo de tratamento foi de 5 animais por grupo.

4.19 Ensaio de *killing* – células *Natural Killer*

A análise da capacidade de *killing* de células *Natural killer* (NK) foi realizada empregando células NK como efetoras, as quais foram isoladas do baço de camundongos C57BL/6, e células da linhagem B16-F10 como células alvo.

Camundongos C57BL/6 foram pré-tratados com CI a 50 mg/mL ou PBS (grupo controle) por 24h por via I.P., seguido então de inoculação de 5×10^5 células B16-F10 na veia caudal lateral desses animais a fim de recriar a comunicação celular observada nos ensaios *in vivo* anteriores. Os camundongos foram então tratados diariamente com CI ou PBS por mais 72h. Ao final desse período, como descrito no item 4.4, os camundongos foram anestesiados e eutanasiados via deslocamento cervical, e o baço dos animais foram coletados e mantidos em meio DMEM a 4°C contendo 1% de SFB e então macerados com o auxílio do êmbolo de seringas. O conteúdo foi então filtrado empregando *cell strainers* de membrana de 70 µm (Corning, Cat. 431751, Estados Unidos). O conteúdo filtrado foi centrifugado a 1500 RPM por 5 minutos a 4°C. A partir desse pellet, células NK foram isoladas por seleção negativa empregando o kit MACS *NK Cell Isolation Kit* (Miltenyi Biotec, Cat. 130-115-818, Alemanha) seguindo o protocolo descrito pelo fabricante. Após o isolamento, células NK e células B16-F10 foram incubadas no mesmo poço por 16h em placas com fundo em V (Kasvi, Cat. K30-5096V, Brasil), em diferentes razões (1:3, 1:6, 1:9 e 1:12; Célula efetora : Célula alvo) em meio RPMI 1640 (Thermo, Cat. E15840, Estados Unidos) suplementado com 10% de SFB, 1% de piruvato de sódio (Sigma, Cat. P5280, Estados Unidos), 10 mM de HEPES (Sigma, Cat. 7365459, Estados Unidos), 0.1% de 2-mercaptoetanol (Thermo, Cat. 21985023, Estados

Unidos), rIL-15 (50 ng/mL; Miltenyi Biotec, Cat. 130-094-071, Alemanha) e 0.25 µg/mL de penicilina e 0.25 µg/mL de estreptomicina (Sigma, Cat. P3539, Estados Unidos). Após o período de incubação, o conteúdo dos poços foi coletado em tubos de citômetro e as células NK foram marcadas com o anticorpo conjugado *anti-mouse* NK1.1 FITC (BD, Cat. 553164, Estados Unidos) por 30 minutos, seguido de lavagem por centrifugação a 1800 RPM por 3 minutos. Células em apoptose foram marcadas com Annexina-V PE (BD, Cat. 556421, Estados Unidos) e em necrose com 7AAD (BD, Cat. 559925, Estados Unidos). As amostras foram adquiridas no citômetro BD FACSVerse (BD, United States), e analisadas empregando o software FlowJo (FlowJo, Estados Unidos). A distinção entre células NK e B16-F10 foi feita pela marcação com FITC e pelos parâmetros de tamanho e granulosidade (FSC e SSC). Células positivas para Annexina V ou 7AAD foram consideradas como mortas. O N amostral dos grupos controle e CI foi de 3 animais por grupo.

4.20 Análise estatística

Todos os dados são mostrados como Mediana ± Intervalo Interquartil. Diferenças estatísticas entre os grupos foram analisadas empregando Teste de Mann Whitney, Anova ou Teste T com correção de Welch sem assumir desvio padrão igual. As análises foram feitas empregando o software Graph Pad Prisma 6. Valores de $P < 0.05$ foram considerados como estatisticamente significativos. A legenda de cada figura apresenta todas as especificações estatísticas.

5. Resultados

5.1 Detecção de LPS

A análise de possível contaminação do polissacarídeo com LPS foi avaliada por GC-MS. Como evidenciado pela Figura 9, diferentemente da amostra padrão de LPS (Figura 9A) que apresenta os picos cromatográficos em m/z 103 e 257 (correspondentes à estrutura do lipídeo A no LPS), o polissacarídeo CI (Figura 9B) não possui esses picos, indicando ausência de LPS dentro da sensibilidade do método empregado.

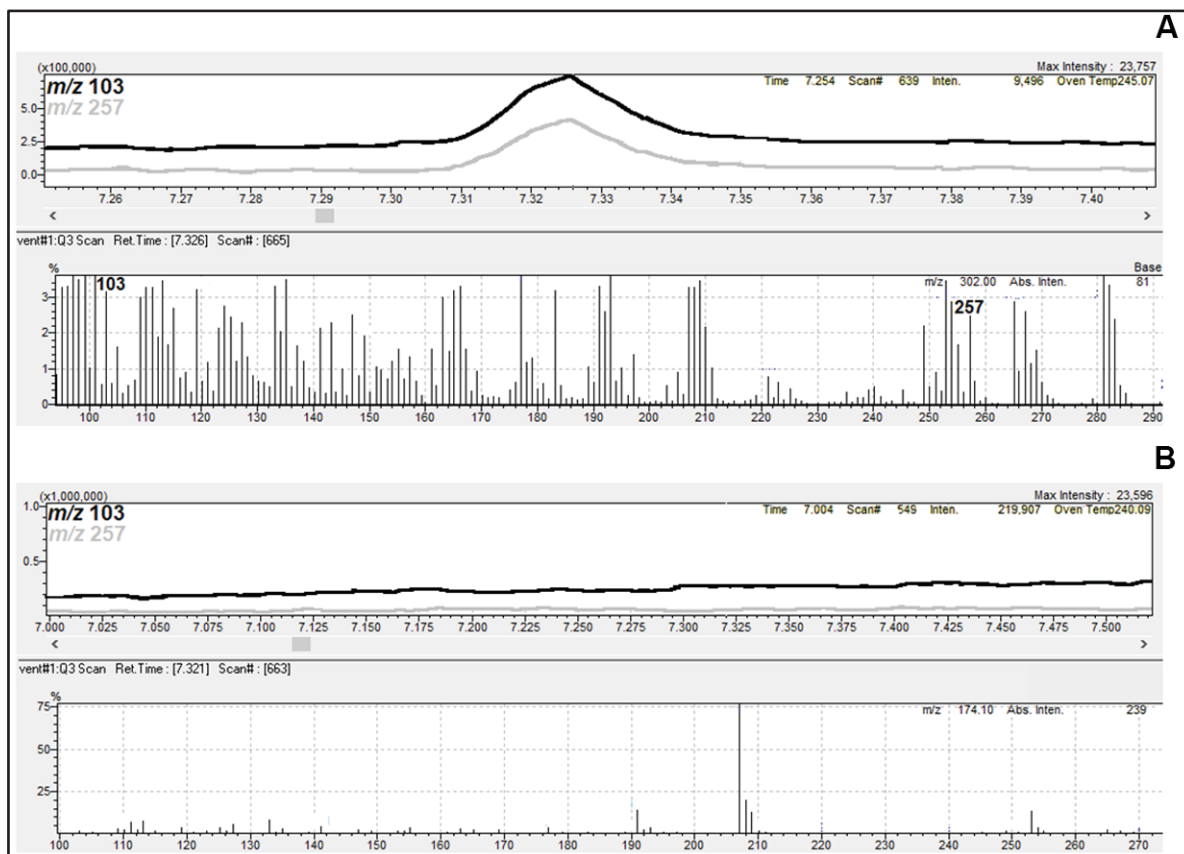


FIGURA 9 – DETECÇÃO DE LPS: A possível contaminação por LPS foi descartada através da análise e comparação dos picos cromatográficos característicos do lipídeo A (presentes na estrutura do LPS) e do polissacarídeo CI. (A) LPS. (B) CI.

5.2 Avaliação do potencial antitumoral: experimentos *in vivo* com modelos de melanoma murino

Os modelos tumorais induzidos, de tumor sólido e de metástase experimental, foram empregados, utilizando para tanto a linhagem de melanoma murino B16-F10, a fim de avaliar o potencial atitumoral do polissacarídeo CI. Possíveis efeitos colaterais do tratamento diário com esse composto também foram avaliados nos ensaios *in vivo*.

5.2.1 Escolha da dose para os estudos

A fim de eleger uma dose para realização dos demais ensaios *in vivo*, foi empregado o modelo de tumor sólido.

Como evidenciado na Figura 10, a dose de 50 mg/Kg foi capaz de diminuir a progressão tumoral, de forma estatisticamente significativa em relação ao controle, resultando em uma redução de 67,9% do peso tumoral (Figura 10D) e de 71,1% do volume tumoral final (Figura 10C), bem como mostrou uma nítida redução do volume

tumoral ao longo do tempo (Figura 10B). A massa dos rins, fígado, glândula adrenal e pulmões dos animais tratados não apresentaram diferenças em relação ao grupo controle, o que foi considerado como um possível indicativo de ausência de toxicidade (Figura 10E-H). Desta forma, a dose de 50 mg/Kg foi selecionada para os ensaios *in vivo* posteriores.

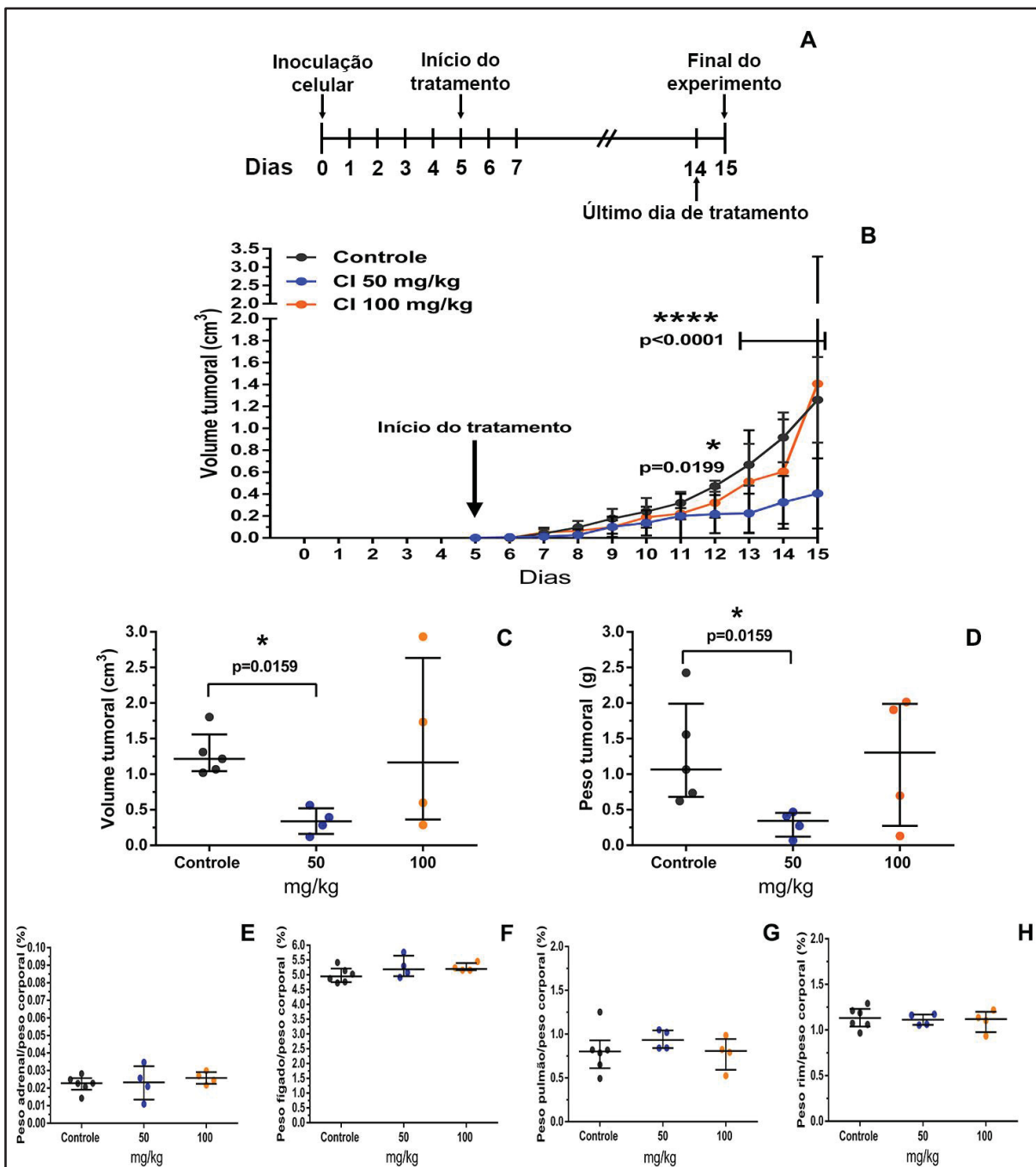


FIGURA 10 – ESCOLHA DA DOSE PARA O DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO: A determinação da dose do polissacarídeo para a execução dos ensaios *in vivo* foi realizada empregando o modelo de tumor sólido e as doses de 50 e 100 mg/Kg. (A) Design experimental. (B) Volume tumoral ao longo do tempo. $*p=0.0199$ (12º dia, Controle x CI 50 mg/Kg); $****p<0.0001$ (13º-15º dias; Controle x CI 50mg/Kg). (C) Volume tumoral final. $*p=0.0159$. (D) Peso tumoral. $*p=0.0159$. (E) Peso da glândula adrenal/peso corporal. (F) Peso do fígado/peso corporal. (G) Peso dos

pulmões/peso corporal. (H) Peso dos rins/peso corporal. Dados resultantes de um experimento biológico, mostrados como Mediana \pm Intervalo interquartil (Controle, N=6; CI, N=5; camundongos machos). (B) Teste de Anova de duas vias com múltiplas comparações. (C-H) Teste de Mann Whitney.

5.2.2 O tratamento com Dacarbazina associada ao CI não modifica a resposta ao quimioterápico

O modelo de tumor sólido induzido pela linhagem B16-F10 foi realizado, empregando o quimioterápico Dacarbazina (Dtic) de forma isolada ou em conjunto com o polissacarídeo, a fim de avaliar uma possível atividade conjunta do composto CI. Como evidenciado na Figura 11, tanto o tratamento com Dtic, quando com Dtic em combinação com CI, diminuíram significativamente o volume tumoral ao longo do tempo (Figura 11B), o volume tumoral final (Figura 11C), bem como o peso tumoral (Figura 11D), mas não foi possível evidenciar diferenças entre os grupos Dtic e Dtic + CI. O tratamento utilizando apenas CI também diminuiu o volume tumoral ao longo do tempo (Figura 11B), repetindo o resultado do experimento de doses (Item 5.2.1). Os efeitos causados pelo quimioterápico eram claramente visíveis no comportamento dos animais tratados, resultando em menor locomoção, pelagem eriçada, menor temperatura corporal e postura corporal arqueada. Nenhum desses efeitos foi observado nos animais que receberam apenas PBS ou apenas CI. Porém, nos parâmetros de peso observados (Figura 11 E-H) não foi possível ver um efeito protetor do polissacarídeo CI em relação aos efeitos induzidos pelo quimioterápico.

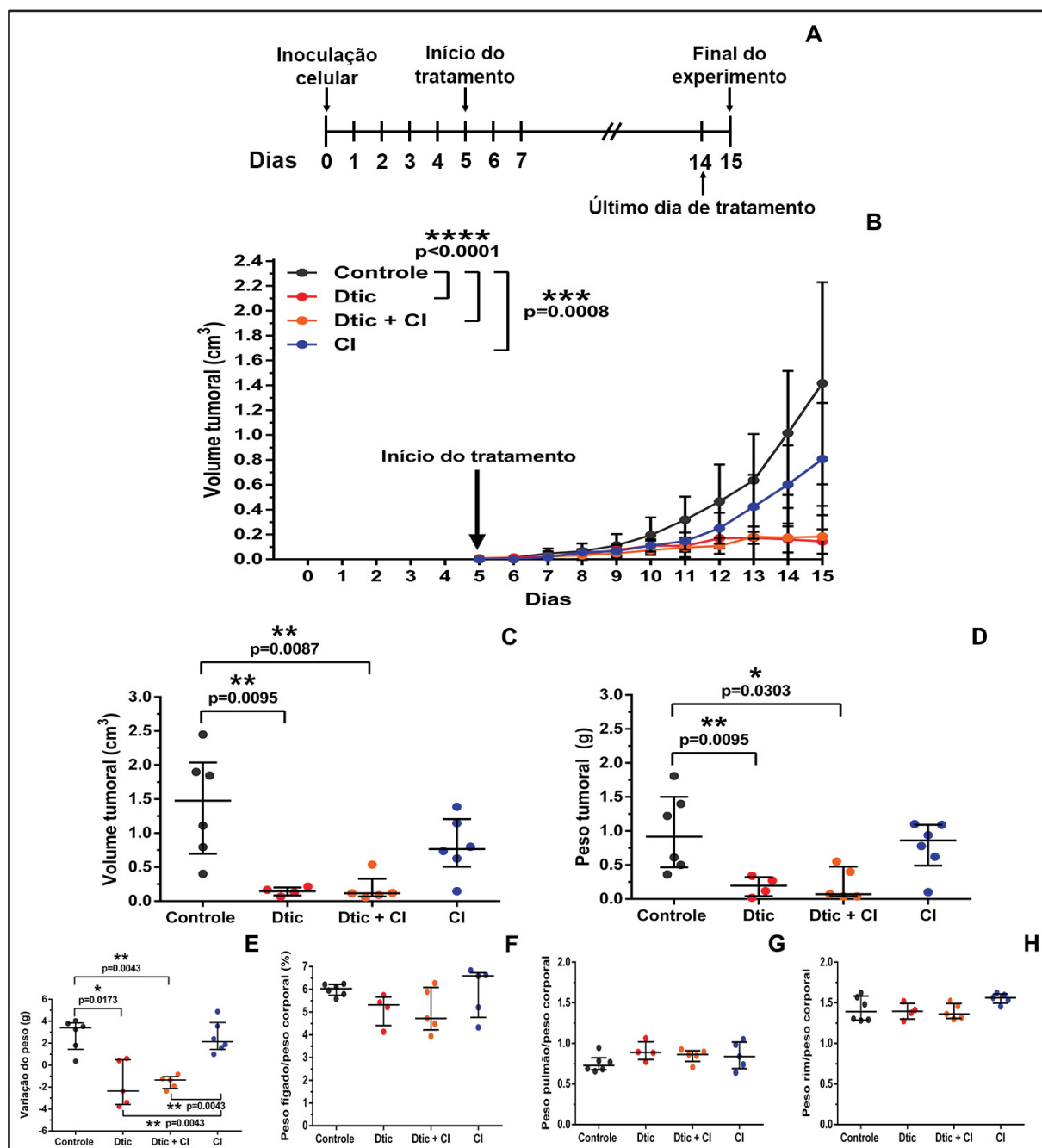


FIGURA 11 – CI NÃO MODIFICA A ATIVIDADE ANTITUMORAL DO QUIMIOTERÁPICO DTIC: O efeito do tratamento diário com 50 mg/Kg do polissacarídeo CI e sua combinação com Dtic foram avaliados empregando o modelo de tumor sólido. (A) Design experimental. (B) Volume tumoral ao longo do tempo. ****p<0.0001 (15º dia, Controle x Dtic e Controle x Dtic + CI); ***p<0.0008 (15º dia, Controle x CI 50mg/Kg). (C) Volume tumoral final. **p=0.0095 (Controle x Dtic); **p=0.0087 (Controle x Dtic+CI). (D) Peso tumoral. **p=0.0095 (Controle x Dtic); *p=0.0303 (Controle x Dtic+CI). (E) Variação do peso dos animais. *p=0.0173 (Controle x Dtic); **p=0.0043 (Controle x Dtic+CI); **p=0.0043 (Dtic x Dtic+CI); **p=0.0043 (Dtic x CI) (F) Peso do fígado/peso corporal. (G) Peso dos pulmões/peso corporal. (H) Peso dos rins/peso corporal. Dados resultantes de um experimento biológico, mostrados como Mediana ± Intervalo interquartil (Controle e CI N=6; Dtic, N=4; Dtic + CI, N=4; camundongos machos). (B) Teste de Anova de duas vias com múltiplas comparações. (C-H) Teste de Mann Whitney.

5.2.3 O desenvolvimento de tumor sólido de melanoma é reduzido pelo tratamento com CI

O modelo de tumor sólido foi novamente repetido, desta vez empregando apenas CI em sua dose previamente determinada e sem o quimioterápico Dtic.

O conjunto de dados de quatro experimentos biologicamente independentes mostra que desde o 7º dia de tratamento diário com o polissacarídeo CI (iniciado cinco dias após a inoculação celular, portanto 12º dia de experimento) o composto reduziu de forma estatisticamente significativa a progressão tumoral em 40,47% (Figura 12B) em relação ao grupo controle. O volume final (Figura 12D) e o peso final (Figura 12E) dos tumores também foram significativamente reduzidos com o tratamento (59,10% e 37,79%, respectivamente). O fígado e o baço dos animais tratados apresentaram maior peso do que nos animais do grupo controle (Figura 12F e 12H, respectivamente). Estes resultados nos levaram a avaliar se o composto seria capaz de interferir no tratamento de quimioterapia, bem como alterar a alta capacidade metastática da linhagem B16-F10 em modelo de metástase experimental.

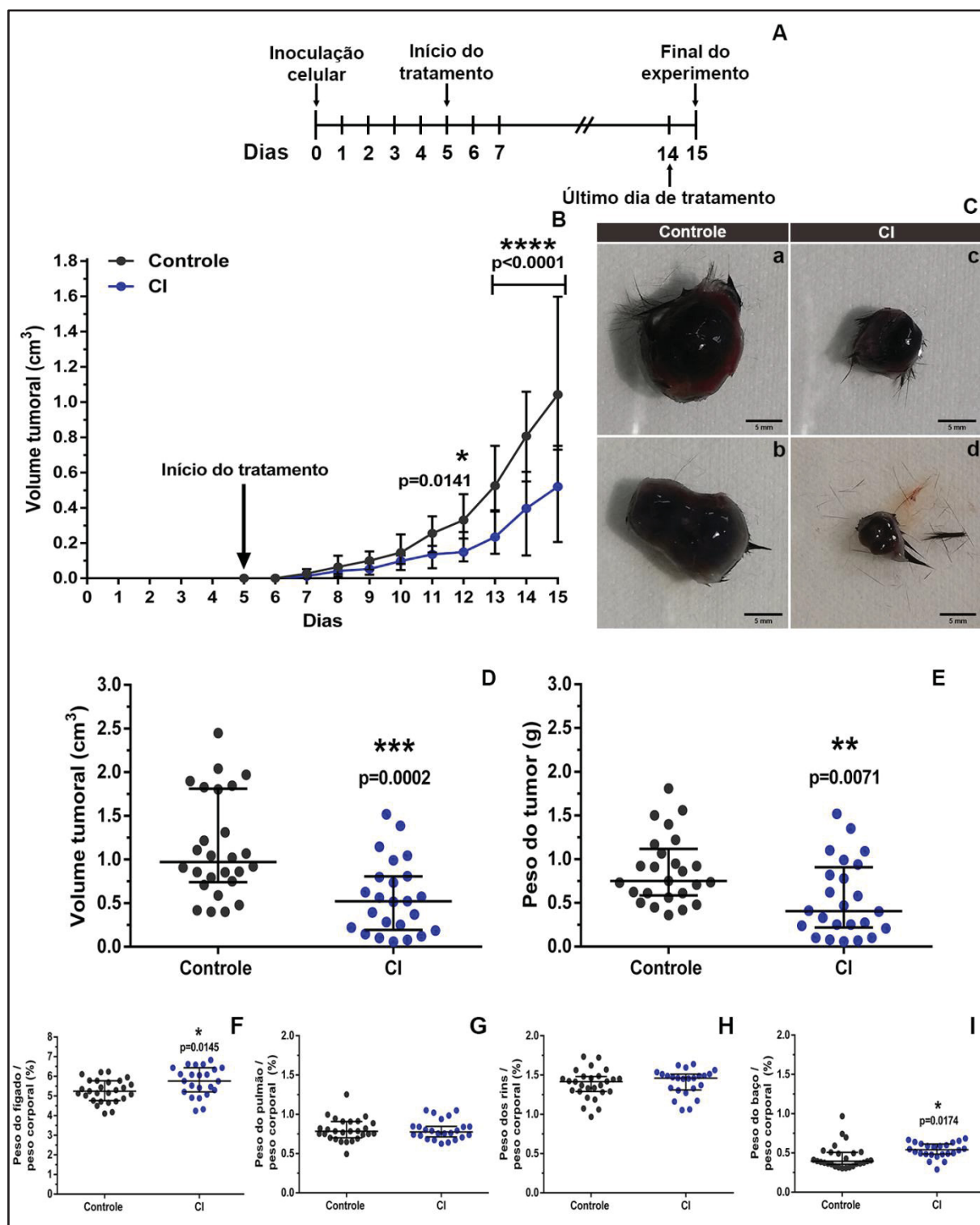


FIGURA 12 – CI DIMINUI O DESENVOLVIMENTO DO TUMOR SÓLIDO: O efeito do tratamento diário com 50 mg/Kg do polissacarídeo CI foi avaliado empregando o modelo de tumor sólido. (A) Design experimental. (B) Volume tumoral ao longo do tempo. *p=0.0141 (12º dia); ****p<0.0001 (13º-15º dias). (C) Tumores. (a-b) Controle. (c-d) CI 50 mg/Kg. (D) Volume tumoral final. ***p=0.0002. (E) Peso tumoral. **p=0.0071. (F) Peso do fígado / peso corporal (%) *p=0.0145 (G) Peso do pulmão / peso corporal (%) (H) Peso dos rins / peso corporal (%) (I) Peso do baço / peso corporal (%) *p=0.0174. Dados resultantes de quatro experimentos biologicamente independentes, mostrados como Mediana ± Intervalo interquartil (Controle, N=26; CI, N=24; camundongos machos). (B) Teste de Anova de duas vias com múltiplas comparações. (D-I) Teste de Mann Whitney.

5.2.4 A formação de tumores primários induzida pelo modelo de metástase experimental de melanoma murino e câncer de mama humano é reduzida pelo tratamento com CI

A progressão de tumores para o estágio metastático é responsável por mais de 90% das mortes relacionadas ao câncer (Lambert, Pattabiraman e Weinberg, 2016), sendo desta forma de grande interesse a busca por compostos que interfiram nesse processo. Para este estudo empregando o modelo de metástase experimental induzido pela linhagem B16-F10 e a capacidade do composto CI em reduzir o desenvolvimento metastático foi avaliada.

O pré-tratamento com CI a 50 mg/Kg 24h antes da inoculação celular da linhagem B16-F10, seguido do tratamento diário por mais 20 dias reduziu de forma estatisticamente significativa a área colonizada por células tumorais dos pulmões dos animais tratados (77.03% menos áreas de metástase em relação ao controle; Figura 13C), efeito evidente na comparação das imagens e na histologia dos pulmões do grupo controle (Figura 13Ba-d e Figura 13Da-d) com o grupo tratado (Figura 13Be-h e Figura 13De-h).

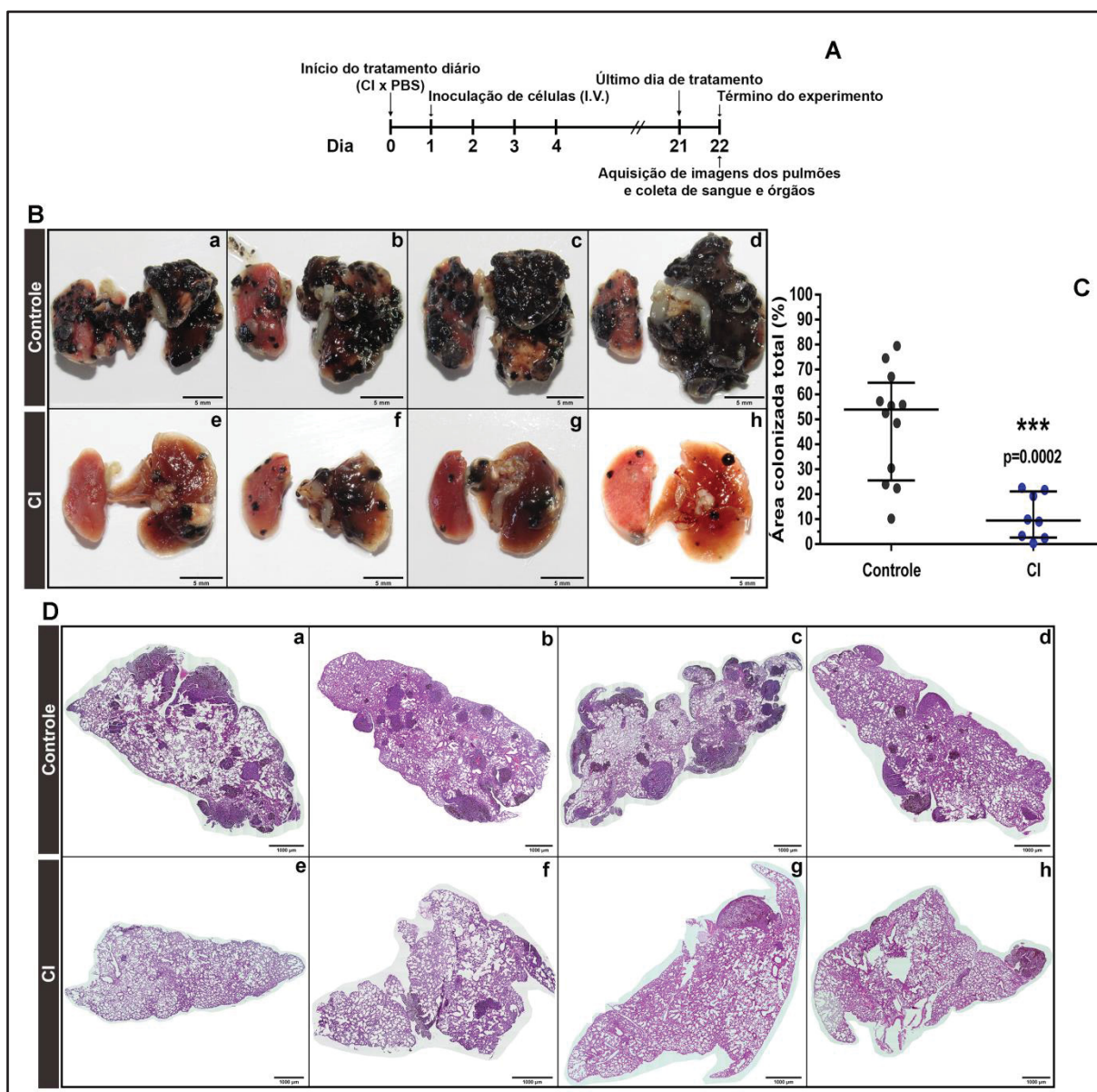


FIGURA 13 – A COLONIZAÇÃO PULMONAR É DIMINUÍDA PELO TRATAMENTO COM CI (21 DIAS): A capacidade do composto CI em diminuir o desenvolvimento de tumores primários induzidos pelo modelo de metástase experimental foi avaliada empregando o modelo de metástase experimental com 21 dias de tratamento diário. (A) Design experimental. (B) Pulmões. (a-d) Controle. (e-h) CI. (C) Área pulmonar colonizada total. ***p=0.0002. (D) Histologia dos pulmões. (a-d) Controle. (e-h) CI. Dados resultantes de um experimento biológico, mostrados como Mediana ± Intervalo interquartil (Controle, N=12; CI, N=9; camundongos fêmeas). (C) Teste de Mann Whitney.

A fim de compreender como o polissacarídeo afeta o desenvolvimento metastático, buscou-se avaliar os dias iniciais do modelo de metástase experimental, empregando o imageamento de tumores pelo sistema IVIS (conforme descrito em Material e Métodos). Novamente, após 24h de pré-tratamento com o polissacarídeo CI, células B16-F10 foram inoculadas pela veia caudal dos camundongos. No entanto para essa abordagem foram utilizadas células que expressam luciferase,

enzima capaz de converter a luciferina gerando bioluminescência, que é captada pelo sistema de imageamento *in vivo* (IVIS). Os resultados mostraram que não foi observado diferença na distribuição das células entre os grupos controle e tratado, como evidenciado pela captura de bioluminescência 2h após a inoculação das células (Figuras 14B e 14C, camundongos fêmeas [2h], e Figuras 15B e 15C, camundongos machos [2h]). Na captura subsequente de imagens feita 9 dias pós inoculação, os camundongos tratados com CI apresentaram visualmente menor número de células tumorais do que o grupo controle (Figuras 14B e 14C, camundongos fêmeas [9d], e Figura 15B e 15C, camundongos machos [9d]). Ao final do experimento, a análise *ex vivo* dos órgãos dos camundongos fêmeas e machos tratados com CI (Figuras 14D e 15D, respectivamente) apresentaram redução no número de células tumorais em relação ao grupo controle, como observado pelos valores de bioluminescência. Este fenômeno é estatisticamente significativo no baço e no pâncreas dos camundongos fêmeas e nos rins dos camundongos machos. A incidência de focos metastáticos nos órgãos dos animais tratados com CI também foi reduzida em relação ao grupo controle em todos os órgãos com exceção dos pulmões, que tiveram presença similar (Figura 14E e 15E), como observado pela ausência de detecção de sinal nesses órgãos.

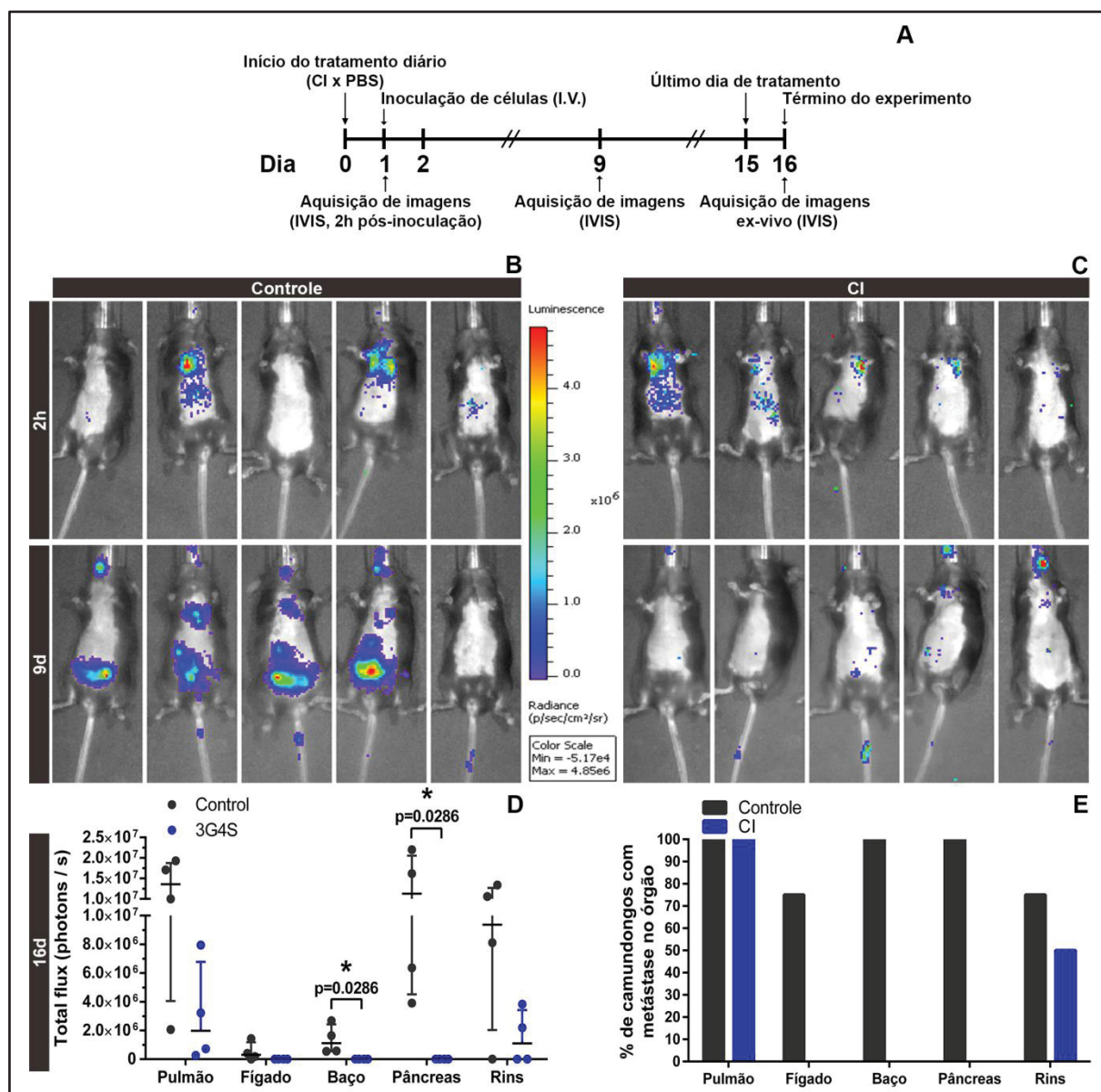


FIGURA 14 – DIMINUIÇÃO DO DESENVOLVIMENTO DE METÁSTASES EM CAMUNDONGOS FÊMEAS: Empregando o sistema de imageamento *in vivo* IVIS foi possível avaliar o efeito do tratamento diário com CI no modelo de metástase experimental em camundongos fêmeas com o uso de células que expressam luciferase, conforme descrito em Material e Métodos. (A) Design experimental. (B) Controle. (C) CI. (D) Bioluminescência dos órgãos *ex vivo*. *p=0.0286 (Baço); *p=0.0286 (Pâncreas). (E) Presença de focos metastáticos no órgão especificado. Dados resultantes de um experimento biológico, mostrados como Mediana \pm Intervalo interquartil (Controle, N=5; CI, N=5; camundongos fêmeas). (D) Teste de Mann Whitney.

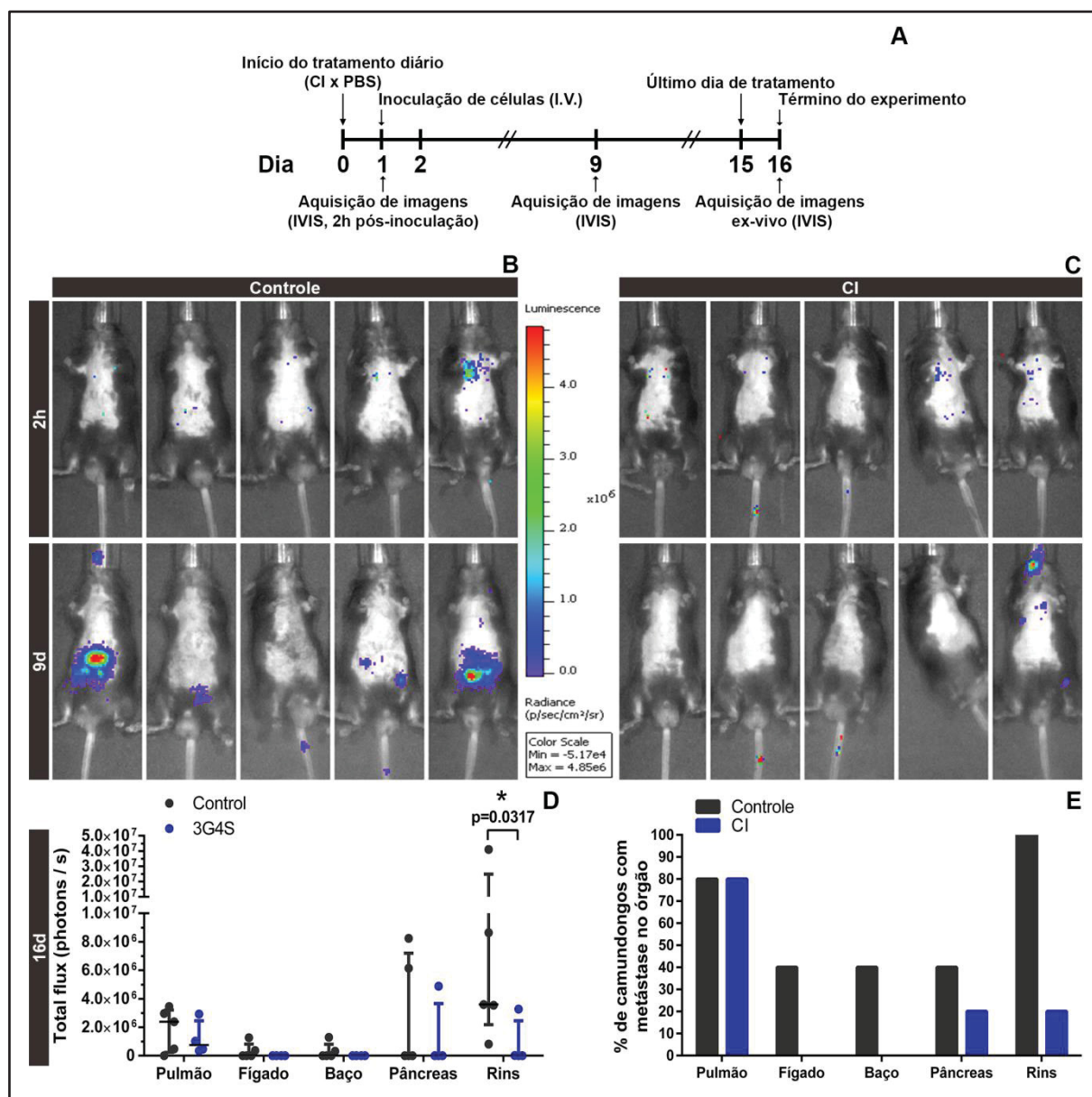


FIGURA 15 – DIMINUIÇÃO DO DESENVOLVIMENTO DE METÁSTASE EM CAMUNDONGOS MACHOS: Empregando o sistema de imageamento *in vivo* IVIS o efeito do tratamento diário com CI foi avaliado no modelo de metástase experimental em camundongos machos, com o uso de células que expressam luciferase, conforme descrito em Material e Métodos. (A) Design experimental. (B) Controle. (C) CI. (D) Bioluminescência dos órgãos *ex vivo*. *p=0.0317. (E) Presença de focos metastáticos no órgão especificado. Dados resultantes de um experimento biológico, mostrados como Mediana \pm Intervalo interquartil (Controle, N=5; CI, N=5; camundongos machos). (D) Teste de Mann Whitney.

Ao repetir o modelo de metástase experimental induzido pela linhagem B16-F10 e finalizar o ensaio após 9 dias após inoculação das células tumorais – mesmo tempo da captura de bioluminescência via IVIS que já demonstrava diminuição da progressão metastática – foi possível evidenciar significativa redução. Como demonstrado pela Figura 16, os pulmões de camundongos C57BL/6 pré-tratados por

24h com CI, inoculados com a linhagem B16-F10 pela veia caudal lateral e tratados diariamente por mais 9 dias, apresentou 74,79% menos focos metastáticos do que o grupo controle (Figura 16C).

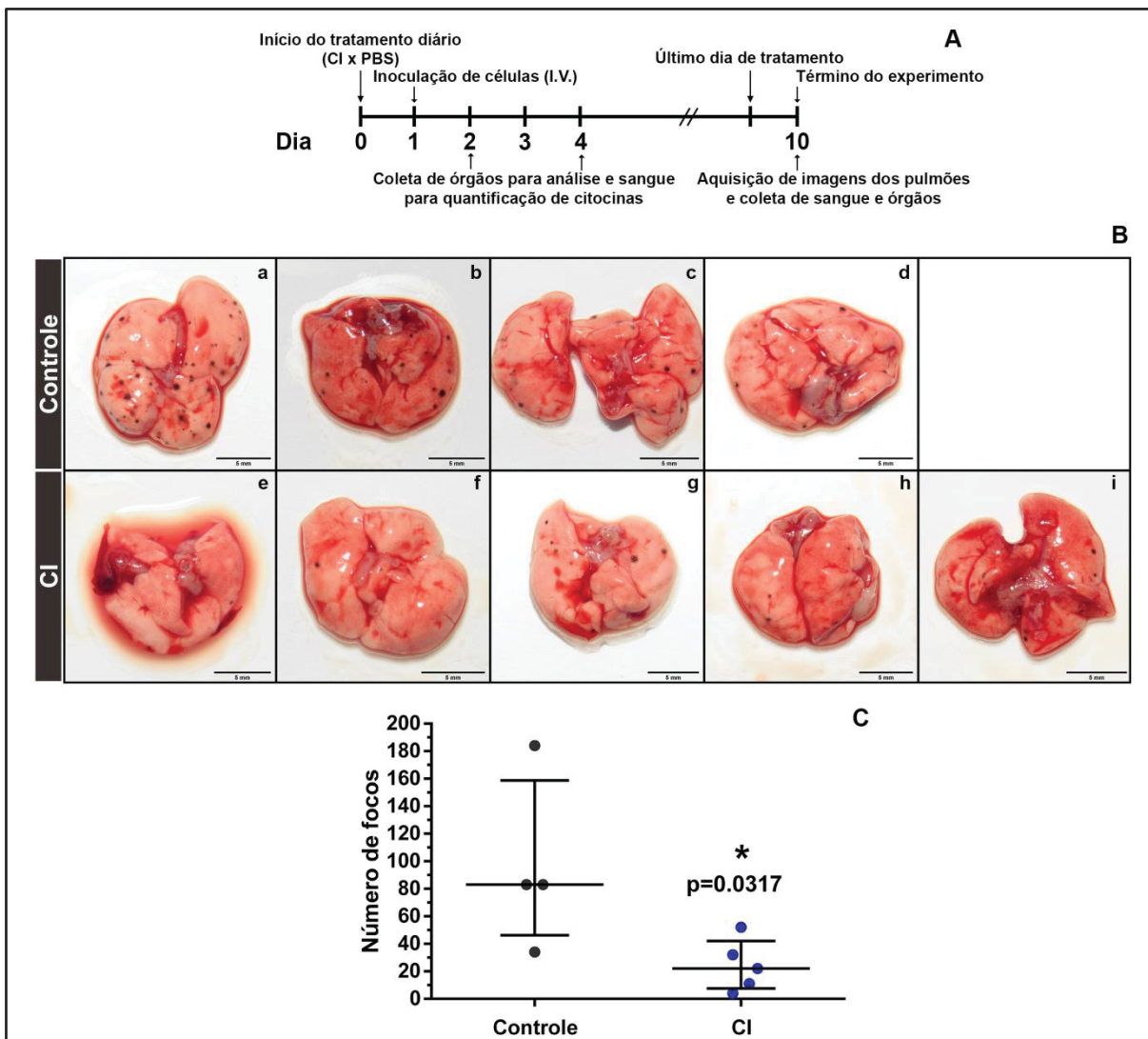


FIGURA 16 – DIMINUIÇÃO DE FOCOS METASTÁTICOS (9 DIAS): A modulação da progressão metastática pelo composto CI foi avaliada após um período reduzido de tratamento, empregando o modelo de metástase experimental. (A) Design experimental. (B) Pulmões. (a-d) Controle. (e-i) CI. (C) Número de focos metastáticos. *p=0.0317. Dados resultantes de um experimento biológico, mostrados como Médiana ± Intervalo interquartil (Controle, N=4; CI, N=5; camundongos fêmeas). (C) Teste de Mann Whitney.

Empregando a linhagem MDA-MB-231-luc avaliou-se a capacidade antitumoral do composto CI em outro modelo tumoral, em câncer de mama humano. O pré-tratamento de 24h com CI na dose de 50 mg/Kg seguido de tratamento diário por mais 27 dias após a inoculação das células na veia caudal de camundongos NSG também mostrou-se efetivo em diminuir o desenvolvimento de metástases (Figura 17). De forma similar ao modelo de melanoma murino, após 9 dias da

inoculação das células, camundongos tratados com CI já apresentavam uma aparente redução de focos metastáticos, como demonstrado pela diminuição da bioluminescência capturada pelo equipamento IVIS (Figura 17B). No imageamento seguinte (16º dia) essa redução passou a ser estatisticamente significativa, sendo que tal diminuição significativa se repetiu em todas as capturas de bioluminescência seguintes (Figura 17C), assim como na análise *ex-vivo* dos pulmões dos camundongos ao final do experimento (Figura 16E), com o grupo tratado com CI apresentando uma diminuição de 68.2% na quantidade de focos metastáticos. Os demais órgãos analisados de forma *ex vivo* não apresentaram bioluminescência em nenhum dos animais.

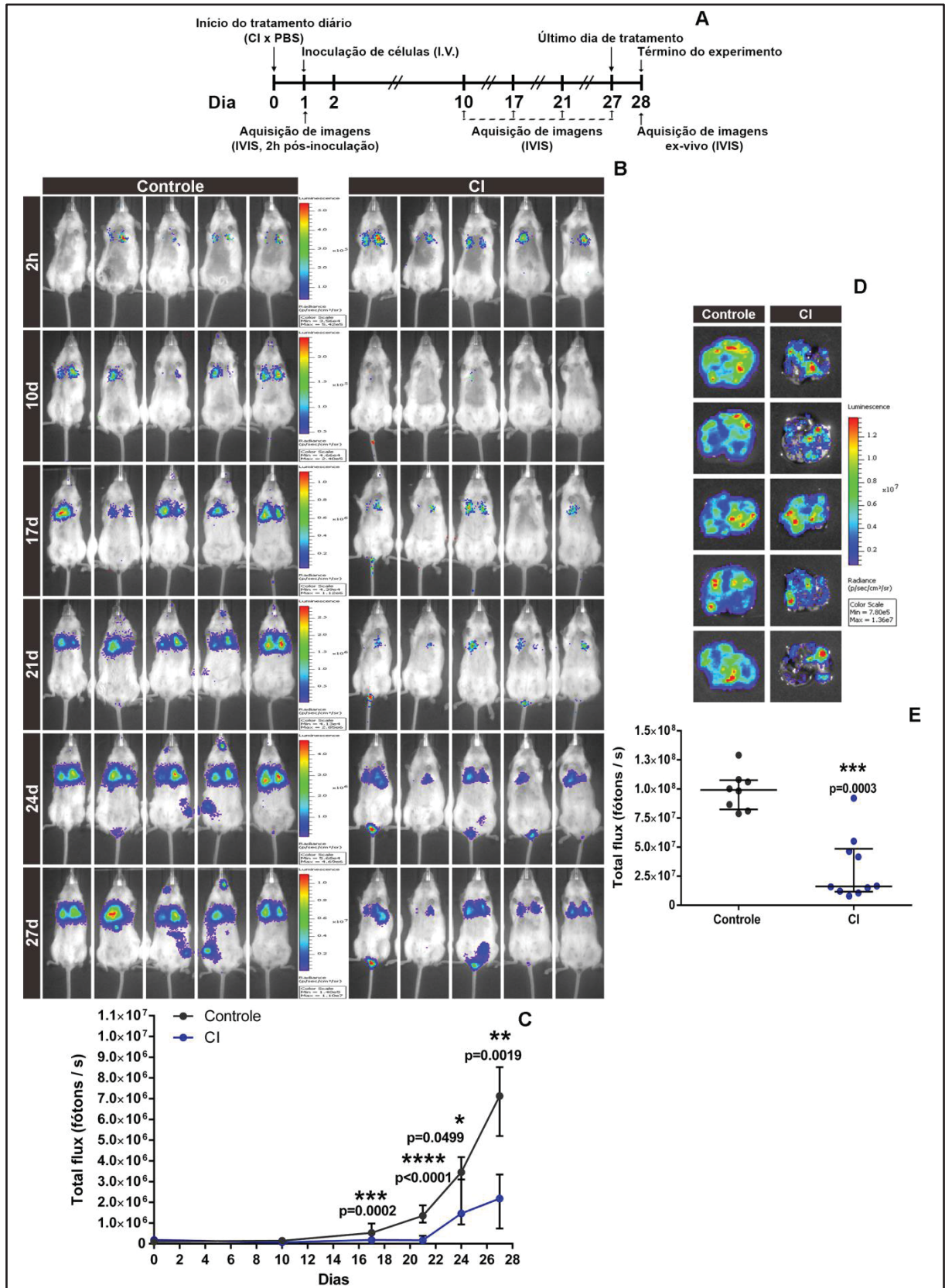


Figura 17 – CI REDUZ O DESENVOLVIMENTO TUMORAL EM CÂNCER DE MAMA HUMANO: Empregando células que expressam luciferase e o sistema IVIS, o efeito do tratamento diário com CI foi avaliado no modelo de metástase experimental em câncer de mama humano. (A) Design experimental. (B) Captura de bioluminescência ao longo do tempo. (C) Análise da bioluminescência ao longo do tempo. *** $p=0.0002$ (17º dia); **** $p<0.0001$ (21º dia); * $p=0.0499$ (24º dia); ** $p=0.0019$

(27º dia). (D) Bioluminescência dos pulmões *ex vivo*. (E) Análise da bioluminescência dos pulmões *ex vivo*. *** $p=0.0003$. Dados resultantes de um experimento biológico, mostrados como Mediana \pm Intervalo interquartil (Controle, N=10; CI, N=10; camundongos fêmeas). (C) e (E) Teste de Mann Whitney.

5.2.5 O tratamento diário com CI não induz efeitos colaterais detectáveis pelos métodos empregados

A grande quantidade de efeitos colaterais nas diferentes abordagens de tratamento do câncer, e do melanoma, é um desafio clínico a ser superado (Kroschinsky *et al.*, 2017). A fim de avaliar se os efeitos antitumorais observados para o composto CI são acompanhados de efeitos colaterais, foram realizadas análises das variações de peso, tanto corporal, quanto dos órgãos dos animais, bem como avaliações dos parâmetros bioquímicos e, também, o hemograma em diferentes regimes de tratamento e condições.

Os resultados mostraram que os animais que foram pré-tratados com CI a 50 mg/Kg por 24h, seguidos pela inoculação com células da linhagem B16-F10 na veia caudal e tratados diariamente por mais 72h com o composto, não apresentaram alteração significativa da massa corporal em relação ao grupo controle, assim como não tiveram alterações significativas na massa dos pulmões, rins e coração, como evidenciado na Tabela 2. A massa do baço e do fígado dos animais tratados apresentou aumento significativo em relação ao grupo controle (34,31% e 12,99% respectivamente). Apesar do aumento da massa destes órgãos nos animais tratados, a análise bioquímica dos níveis de aspartato aminotransferase, creatinina e gama GT não apresentaram alterações em relação ao grupo controle.

Tabela 2: Avaliação de possíveis efeitos colaterais com o tratamento de CI por 96h

Parâmetro	Unidade	Controle	CI	Valor de <i>P</i>
Regime de tratamento: 96h				
Variação da massa corporal	%	6,642 ± 2,904	6,269 ± 3,104	0,6667
Massa dos pulmões/massa corporal	%	0,9055 ± 0,06421	0,9046 ± 0,08212	0,8016
Massa do baço/massa corporal	%	0,5785 ± 0,05522	0,7770 ± 0,08916 *	0,0159
Massa do fígado/massa corporal	%	5,447 ± 0,2736	6,155 ± 0,4661 *	0,0317
Massa dos rins/massa corporal	%	1,320 ± 0,09495	1,412 ± 0,06529	0,3095
Massa do coração/massa corporal	%	0,5654 ± 0,03832	0,5191 ± 0,03079	0,2222
Parâmetros bioquímicos				
Aspartato aminotransferase	U/L	56,58 ± 29,6	47,57 ± 6,048	0,4000
Creatinina	mg/dL	0,36 ± 0,05477	0,34 ± 0,05477	>0,999
Gama GT	U/L	4,24 ± 2,057	5,0 ± 2,995	0,7857

Análise de parâmetros fisiológicos e bioquímicos de camundongos tratados não (grupo controle) com 50 mg/Kg de CI durante 96h. Células B16-F10 foram inoculadas na veia caudal 24h após o primeiro tratamento. Os dados são representados como Média ± Desvio Padrão e correspondem aos valores de 4 animais por grupo. Teste T de Mann Whitney realizado para análise estatística. FONTE: próprio autor (2020).

Repetindo a abordagem experimental anterior, mas com regime de tratamento de 9 dias após inoculação das células, animais tratados com CI não apresentaram alteração significativa da massa corporal, da massa dos rins, fígado e pulmões, em relação ao grupo controle, apresentando apenas aumento significativo da massa do baço (25,18%; Tabela 3). A análise bioquímica dos níveis de fosfatase alcalina, creatinina e gama GT não apresentaram alterações significativas em relação ao grupo controle.

Tabela 3: Avaliação de possíveis efeitos colaterais com o tratamento de CI por 10 dias.

Parâmetro	Unidade	Controle	CI	Valor de <i>P</i>
Regime de tratamento: 10 dias				
Variação da massa corporal	%	8,05 ± 2,644	11,37 ± 2,538	0,0952
Massa dos pulmões/massa corporal	%	0,7799 ± 0,1211	0,7758 ± 0,1354	0,8016
Massa do baço/massa corporal	%	0,4915 ± 0,04467	0,6153 ± 0,04842 **	0,0079
Massa do fígado/massa corporal	%	5,611 ± 0,4878	6,031 ± 0,4204	0,3095
Massa dos rins/massa corporal	%	1,216 ± 0,02170	1,233 ± 0,1568	0,6667
Parâmetros bioquímicos				
Fosfatase alcalina	U/L	95,88 ± 8,115	60,4 ± 5,662	0,0286
Creatinina	mg/dL	0,425 ± 0,05	0,35 ± 0,05774	0,2857
Gama GT	U/L	4,85 ± 2,068	5,833 ± 2,04	0,5714

Análise de parâmetros fisiológicos e bioquímicos de camundongos tratados ou não (grupo controle) com 50 mg/Kg de CI durante 10 dias. Células B16-F10 foram inoculadas na veia caudal 24h após o primeiro tratamento. Os dados são representados como Média ± Desvio Padrão e correspondem aos valores de 4 animais por grupo. Teste T de Mann Whitney realizado para análise estatística. FONTE: próprio autor (2020).

A análise de possíveis efeitos colaterais ocasionados por 21 dias de tratamento diário com CI durante o desenvolvimento do modelo de metástase experimental demonstraram uma variação negativa do peso corporal dos camundongos controle (em média -1,298 g) e um aumento do peso dos animais tratados (em média +1,375 g), como evidenciado na Tabela 4. A massa dos pulmões dos animais controle foi 57,54% maior do que dos camundongos tratados. O peso do baço e do fígado dos animais tratados com CI também foi aumentada em relação ao grupo controle (24,83% e 18,82% respectivamente). Apesar dessas variações encontradas, nenhum dos parâmetros bioquímicos apresentou diferenças significativas entre grupo controle e tratado, possivelmente indicando ausência de efeitos colaterais significativos. Da mesma forma, não foram identificadas diferenças significativas em nenhum dos parâmetros de hemograma avaliados.

Tabela 4: Avaliação de possíveis efeitos colaterais com o tratamento de CI por 22 dias.

Parâmetro	Unidade	Controle	CI	Valor do <i>P</i>
Regime de tratamento: 22 dias				
Varição da massa corporal	%	- 1,298 ± 2,027	+ 1,375 ± 0,6455 ***	0,0005
Massa dos pulmões/massa corporal	%	2,224 ± 1,135	0,9443 ± 0,1482 **	0,0011
Massa do baço/massa corporal	%	0,421 ± 0,09374	0,5601 ± 0,05745 **	0,0022
Massa do fígado/massa corporal	%	5,215 ± 0,4865	6,424 ± 0,4598 ****	<0,0001
Massa dos rins/massa corporal	%	1,527 ± 0,09001	1,512 ± 0,04374	0,7102
Parâmetros bioquímicos				
Alanina aminotransferase	U/L	45,84 ± 11,27	54,53 ± 7,751	0,1419
Aspartato aminotransferase	U/L	130,2 ± 53,05	179,6 ± 48,84	0,1079
Creatinina	mg/dL	0,375 ± 0,04629	0,3667 ± 0,05164	>0,9999
Ureia	mg/dL	59,88 ± 5,802	51,95 ± 5,685	0,0593
Colesterol total	mg/dL	81,49 ± 4,041	75,85 ± 6,95	0,1512
Triglicerídeos	mg/dL	100,9 ± 15,06	90,53 ± 23,36	0,3983
VLDL	mg/dL	20,19 ± 2,998	18,1 ± 4,704	0,3983
Procalcitonina	%	0,2443 ± 0,0336	0,2378 ± 0,03207	0,7193
Contagem de células sanguíneas				
Leucócitos	$\times 10^3$ / μ L	6,088 ± 1,454	7,783 ± 1,534	0,1325
Linfócitos	$\times 10^3$ / μ L	4,475 ± 0,9498	5,75 ± 1,343	0,0593
Monócitos	$\times 10^3$ / μ L	0,125 ± 0,04629	0,15 ± 0,05477	0,5884
Granulócitos	$\times 10^3$ / μ L	1,488 ± 0,7019	1,883 ± 0,5636	0,2278
Parâmetros de hemácias				
Hemácias	$\times 10^6$ / μ L	8,237 ± 0,4923	7,775 ± 0,4598	0,0734
Volume corpuscular médio	fL	41,3 ± 1,223	40,67 ± 1,472	0,5589
Hemoglobina corpuscular média	pg	12,09 ± 0,2673	11,8 ± 0,3162	0,1282
Comprimento médio de célula vermelha	%	15,79 ± 1,145	16,02 ± 0,5672	0,3817
Parâmetros de plaquetas				
Plaquetas	$\times 10^3$ / μ L	421,5 ± 53,71	395,5 ± 52,76	0,4715
Volume plaquetário médio	fL	5,8 ± 0,1309	6,033 ± 0,3141	0,1275
Comprimento médio de plaqueta	%	14,74 ± 0,1847	14,9 ± 0,2757	0,3124

Análise de parâmetros fisiológicos, bioquímicos e hemograma de camundongos tratados ou não (grupo controle) com 50 mg/Kg de CI durante 22 dias. Células B16-F10 foram inoculadas na veia caudal 24h após o primeiro dia de tratamento com CI. Os dados são representados como Média ± Desvio Padrão e correspondem aos valores de no mínimo 6 animais por grupo. Teste T de Mann Whitney realizado para análise estatística.

Possíveis efeitos colaterais causados pelo tratamento com CI também foram avaliados em animais que não foram inoculados com células tumorais. Camundongos tratados diariamente com 50 mg/Kg de CI por 7 dias não apresentaram diferenças em relação ao grupo controle quanto a massa corporal,

massa dos órgãos (baço, pulmões, fígado, rins e coração), assim como não diferiram em relação aos parâmetros bioquímicos e hematológicos analisados (Tabela 5).

Tabela 5: Avaliação de possíveis efeitos colaterais com o tratamento de CI por 7 dias em animais não portadores de tumores.

Parâmetro	Unidade	Controle	CI	Valor de <i>P</i>
Regime de tratamento: 7 dias				
Variação da massa corporal	%	-0,1893 ± 0,6595	-0,3893 ± 2,381	0,7
Massa do baço/massa corporal	%	0,4002 ± 0,02926	0,6578 ± 0,02567	0,1
Massa dos pulmões/massa corporal	%	1,241 ± 0,2505	1,016 ± 0,1802	0,7
Massa do fígado/massa corporal	%	5,351 ± 0,4217	5,841 ± 0,6258	0,4
Massa dos rins/massa corporal	%	1,278 ± 0,02018	1,274 ± 0,02437	0,7
Massa do coração/massa corporal	%	0,7483 ± 0,07498	0,6332 ± 0,05289	0,1
Parâmetros bioquímicos				
Ureia nitrogenada	mg/dL	19 ± 2	17 ± 1,732	0,3
Fosfato	mg/dL	10,7 ± 2,536	11,3 ± 1,735	0,9
Bilirubina	mg/dL	0,3667 ± 0,05774	0,2667 ± 0,06667	0,4
Amilase	U/L	1884 ± 20,79	1766 ± 636,1	0,7
Procalcitonina	%	0,4 ± 0,05292	0,6067 ± 0,02887	0,1
Contagem de células sanguíneas				
Neutrófilos	%	7,2 ± 2,606	8,637 ± 4,477	0,7
Linfócitos	%	83,8 ± 3,659	72,4 ± 1,852	0,1
Monócitos	%	7,4 ± 1,127	18,7 ± 4,506	0,1
Eosinófilos	%	1,533 ± 0,5508	1,133 ± 0,4163	0,5
Contagem de hemácias				
Hemácias	M/μL	10,36 ± 0,8179	9,69 ± 0,3012	0,4
Hemoglobina	g/dL	15,77 ± 1,21	14,83 ± 0,4041	0,5
Hematócrito	%	56,27 ± 4,788	52,8 ± 1,652	0,5
Volume corpuscular médio	fL	54,3 ± 0,6083	54,5 ± 0,3606	0,7
Parâmetro de plaquetas				
Plaquetas	K/μL	628,3 ± 64,29	932,7 ± 66,94	0,1
Comprimento médio de plaqueta	fL	7,567 ± 0,5132	7,8 ± 0,5196	>0,9999
Volume plaquetário médio	fL	6,3 ± 0,2646	6,533 ± 0,2082	0,3
Taxa de plaquetas de alto volume	%	3,5 ± 1,572	4,7 ± 1	0,4

Análise de parâmetros fisiológicos, bioquímicos e hemograma de camundongos tratados com não (grupo controle) com 50 mg/Kg de CI durante 7 dias. Os dados são representados como Média ± Desvio Padrão e correspondem aos valores de 3 animais por grupo. Teste T de Mann Whitney realizado para análise estatística. FONTE: próprio autor (2020).

De forma semelhante, após 14 dias de tratamento diário com CI nos animais não portadores de tumores (sem inoculação de células tumorais), os camundongos tratados não apresentaram diferenças na massa corporal, bem como na massa dos

órgãos (baço, pulmões, fígado, rins e coração), assim como não tiveram diferenças nos parâmetros de hemograma analisados (Tabela 6).

Tabela 6: Avaliação de possíveis efeitos colaterais com o tratamento de CI por 14 dias em animais não portadores de tumores.

Parâmetro	Unidade	Controle	CI	Valor de <i>P</i>
Regime de tratamento: 14 dias				
Varição da massa corporal	%	1,327 ± 2,130	0,2559 ± 5,316	0,9
Massa do baço/massa corporal	%	0,3894 ± 0,07443	0,5898 ± 0,05878	0,2
Massa dos pulmões/massa corporal	%	0,9968 ± 0,1770	1,2 ± 0,06573	0,2
Massa do fígado/massa corporal	%	4,746 ± 0,3131	5,635 ± 0,8901	0,2
Massa dos rins/massa corporal	%	1,171 ± 0,1077	1,313 ± 0,07189	0,4
Massa do coração/massa corporal	%	0,4526 ± 0,05871	0,7206 ± 0,02911	0,1
Contagem de células sanguíneas				
Neutrófilos	%	9,3 ± 0,8485	11,87 ± 4,007	0,4
Linfócitos	%	76,6 ± 6,788	63,13 ± 12,33	0,4
Monócitos	%	13,3 ± 5,798	22,93 ± 12,01	0,4
Eosinófilos	%	0,75 ± 0,07071	1,933 ± 1,137	0,2
Contagem de hemácias				
Hemácias	M/μL	10,05 ± 0,5382	8,5 ± 2,212	0,4
Hemoglobina	g/dL	15,27 ± 0,9866	12,9 ± 3,195	0,4
Hematócrito	%	52,9 ± 4,279	44,27 ± 11,93	0,4
Volume corpuscular médio	fL	52,6 ± 1,493	51,97 ± 0,6658	0,7
Parâmetros de plaquetas				
Plaquetas	K/μL	632,7 ± 156,1	908,7 ± 574,2	0,7
Comprimento médio de plaqueta	fL	8,167 ± 0,2517	8,2 ± 0,6557	0,9
Volume plaquetário médio	fL	6,8 ± 0,2	6,733 ± 0,3512	0,9
Taxa de plaquetas de alto volume	%	6,367 ± 1,258	6,133 ± 1,604	0,9

Análise de parâmetros fisiológicos, bioquímicos e hemograma de camundongos tratados ou não (grupo controle) com 50 mg/Kg de CI durante 14 dias. Os dados são representados como Média ± Desvio Padrão e correspondem aos valores de 3 animais por grupo. Teste T de Mann Whitney realizado para análise estatística. FONTE: próprio autor (2020).

5.3 Modulações de dinâmicas associadas à progressão tumoral

Dado os resultados antitumorais observados com o tratamento com o polissacarídeo CI, dinâmicas celulares associadas à progressão tumoral da linhagem B16-F10 foram avaliadas frente ao tratamento *in vitro* com o composto.

5.3.1 A adesão da linhagem B16-F10 é alterada pelo tratamento com CI

A adesão célula-célula e célula-matriz extracelular são altamente alteradas em células malignizadas, possibilitando o desenvolvimento de diferentes etapas da

progressão tumoral, como a metástase (Farahani *et al.*, 2014), tornando essa dinâmica um possível alvo terapêutico. O pré-tratamento por 72h da linhagem B16-F10 com 100 $\mu\text{g/mL}$ de CI, levou a um aumento, de forma estatisticamente significativa, na adesão das células sobre Matrigel, em 11,7% (Figura 18A). A adesão sobre plástico, colágeno I e fibronectina não foi alterada. Da mesma forma, a adesão de células B16-F10 sobre os diferentes componentes da MEC previamente incubados com CI por 24h não foi alterada (Figura 18B).

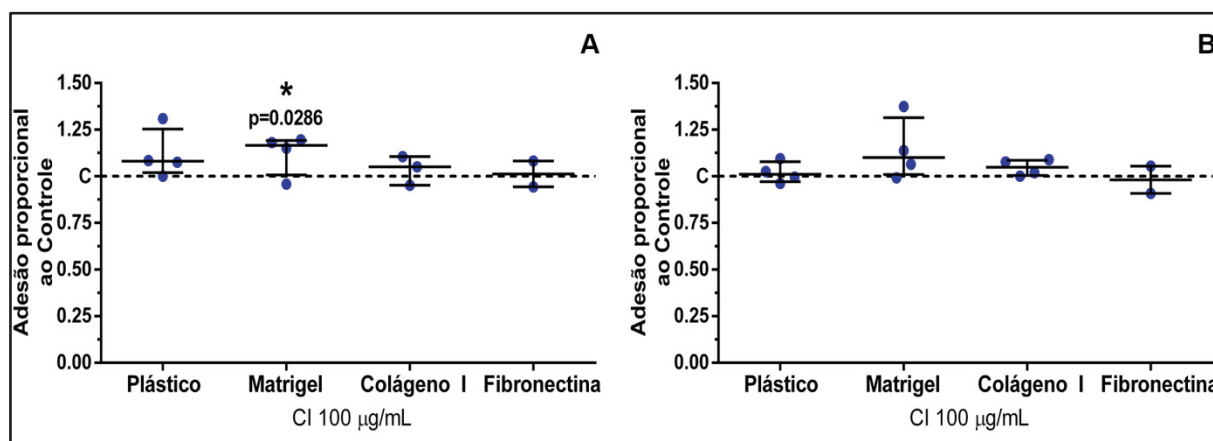


FIGURA 18 – ANÁLISE DE INTERFERÊNCIA DO TRATAMENTO COM CI SOBRE A ADESÃO DAS CÉLULAS DE MELANOMA MURINO A DIFERENTES SUBSTRATOS: Possíveis modulações na capacidade de adesão da linhagem B16-F10 em diferentes substratos após o tratamento com 100 $\mu\text{g/mL}$ de CI por 72h ou após o tratamento dos substratos foram avaliadas. (A) Pré-tratamento das células. * $p=0.0286$. (B) Pré-tratamento dos substratos. Dados resultantes de quatro experimentos biologicamente independentes (para Plástico, Matrigel e Colágeno I; 2 experimentos independentes para Fibronectina) com um mínimo de triplicata técnica em cada ensaio, mostrados como Mediana \pm Intervalo interquartil. Teste de Mann Whitney.

5.3.2 Tratamento com CI diminui a capacidade invasiva da linhagem B16-F10

A capacidade invasiva é um dos traços selecionados durante a progressão tumoral que irão habilitar o processo metastático (Hanahan e Weinberg, 2011). Simulando o processo invasivo empregando uma barreira de Matrigel, observou-se que células B16-F10 tratadas com o polissacarídeo CI a 100 $\mu\text{g/mL}$ por 72h tiveram sua capacidade invasiva reduzida em 27,95% em relação ao grupo controle (Figura 19B).

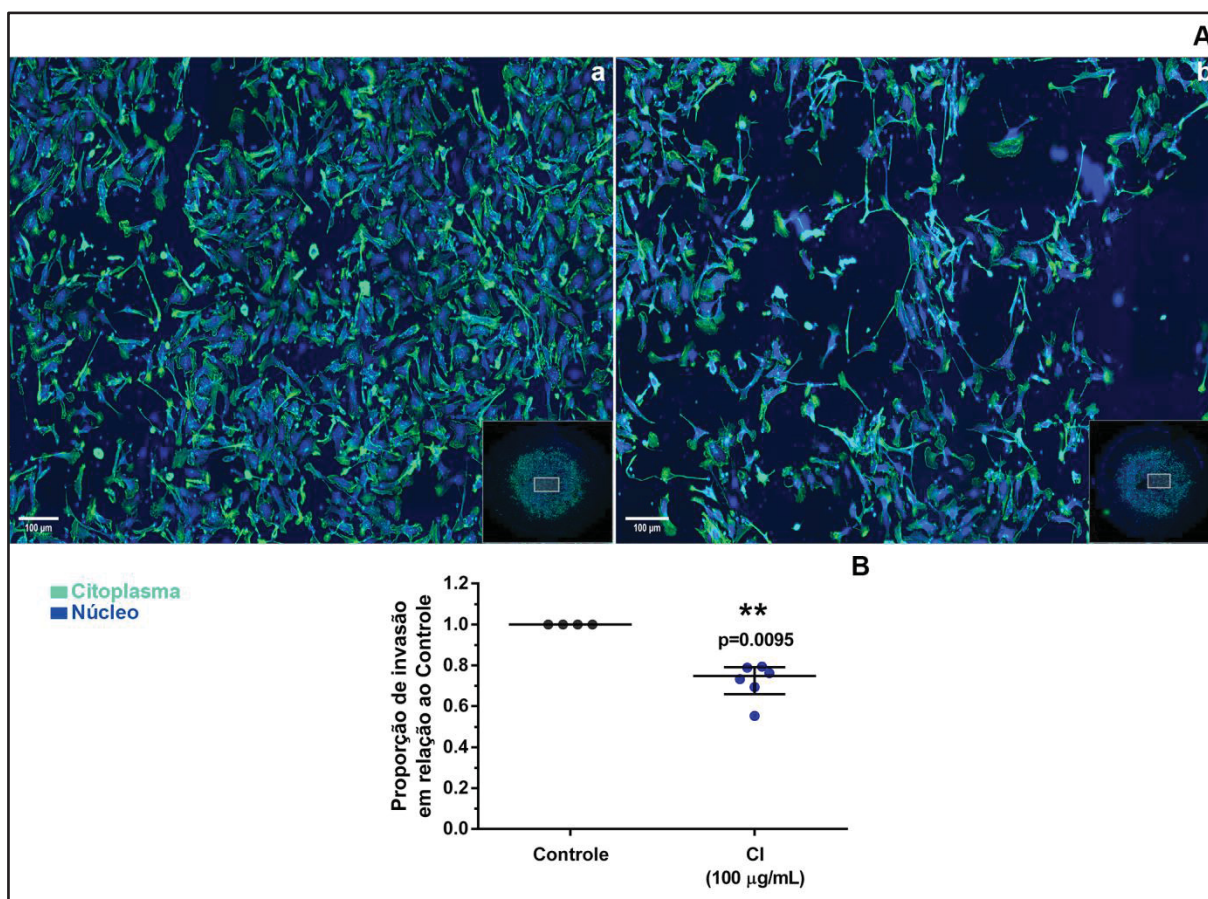


FIGURA 19 – ANÁLISE DA INTERFERÊNCIA DO TRATAMENTO COM CI SOBRE A DINÂMICA DE INVASÃO CELULAR: Alterações da capacidade invasiva da linhagem B16-F10 após o tratamento com 100 µg/mL de CI por 72h foram avaliadas através da invasão por uma barreira de Matrigel. (A) Áreas representativas das membranas. (a) Controle. (b) CI. Citoplasma representado em verde (FITC); núcleo representado em azul (marcado com DAPI). (B) Análise dos ensaios de invasão celular realizados. Dados resultantes de três experimentos biologicamente independentes com duplicata técnica em cada ensaio, mostrados como Mediana ± Intervalo interquartil. Teste de Mann Whitney.

5.3.3 Redução de glicoconjugados após o tratamento com CI

O padrão de glicosilação, como a quantidade de ácido siálico, é modulado por células tumorais a fim de promover dinâmicas celulares associados à progressão tumoral (Schultz, Swindall e Bellis, 2012). Baseado nisto, buscou-se avaliar possíveis alterações da glicosilação de células tratadas com 100 µg/mL por 72h. Observou-se uma redução estatisticamente significativa da marcação positiva com WGA nas células tratadas com CI (33.47%; Figura 20A).

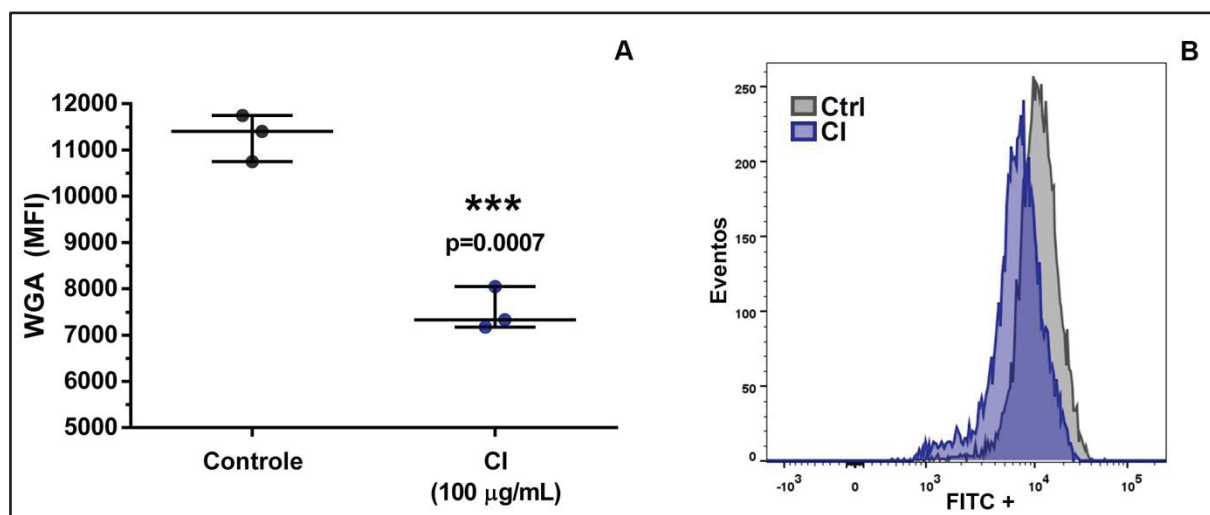


FIGURA 20 – ANÁLISE DA INTERFERÊNCIA DO TRATAMENTO COM CI SOBRE A QUANTIDADE DE GLICOCONJUGADOS DE MEMBRANA: O efeito do tratamento com 100 µg/mL de CI por 72h sobre a presença de glicoconjugados na membrana plasmática da linhagem B16-F10 foi avaliado utilizando citometria de fluxo. (A) Análise da marcação com WGA. ***p=0.0007. (B) Histogramas de Média de Intensidade de Fluorescência. Dados resultantes de três experimentos biologicamente independentes, mostrados como Mediana ± Intervalo interquartil. Teste de Mann Whitney.

5.4 Atividade imunomodulatória

Baseado no papel determinante do sistema imune no desenvolvimento tumoral, bem como na descrição de atividades imunomodulatórias dos polissacarídeos, buscou-se avaliar se o composto CI poderia modular o sistema imune, bem como possíveis relações dessa modulação e sua atividade antitumoral.

5.4.1 CI altera subpopulações do sistema imune presentes no baço

O baço dos camundongos tratados com CI apresentaram aumento de peso em relação ao grupo controle, como demonstrado nos experimentos *in vivo* previamente descritos, o que poderia ser um indicativo da modulação de subpopulações do sistema imune ali presentes. Para avaliação dessa possível atividade, a imunofenotipagem do baço de camundongos C57BL/6 tratados diariamente com CI (50 mg/Kg) sem inoculação de células tumorais foi realizada empregando citometria de fluxo.

O baço dos animais tratados com CI apresentou aumento de 25.11% de peso em relação ao grupo controle. As populações CD3⁺ e CD11b⁺LyC⁺ apresentaram diminuição estatisticamente significativa em animais tratados com CI em relação ao grupo controle (Figura 21A e 21G) na ordem de 31,8% e 56,05% respectivamente. A

população $CD11b^+$ apresentou aumento estatisticamente significativo de 48,11% (Figura 21F).

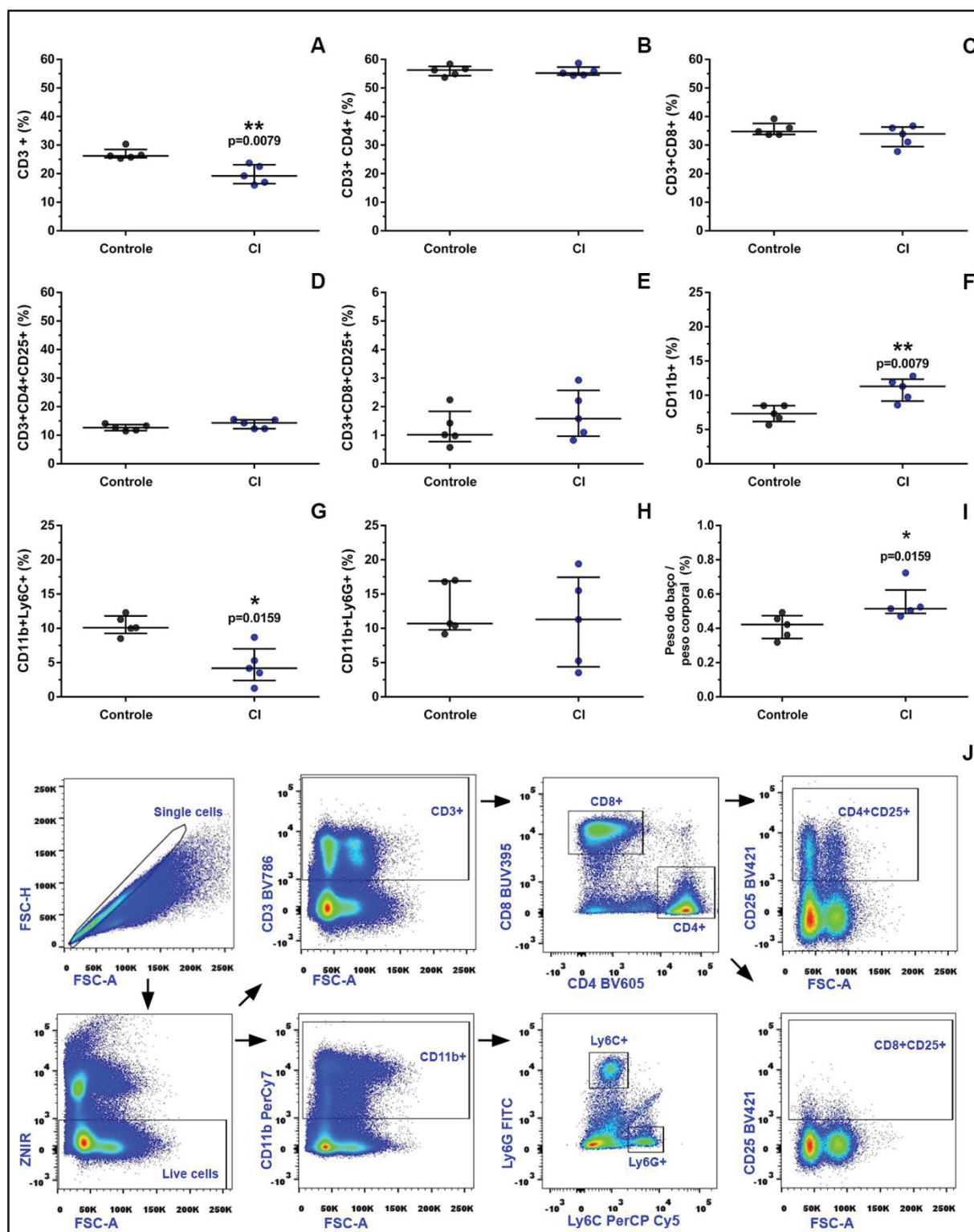


FIGURA 21 – IMUNOFENOTIPAGEM DE CÉLULAS OBTIDAS DO BAÇO DE CAMUNDONGOS TRATADOS COM CI: Possíveis modulações em subpopulações de células imunológicas no baço de animais tratados com CI foram avaliadas por citometria de fluxo. (A) CD3⁺. **p=0.0079. (B) CD3⁺CD4⁺. (C) CD3⁺CD8⁺. (D) CD3⁺CD4⁺CD25⁺. (E) CD3⁺CD8⁺CD25⁺. (F) CD11b⁺. **p=0.0079. (G) CD11b⁺Ly6C⁺ * p=0.0159. (H) CD11b⁺Ly6G⁺. (I) Peso do baço/peso corporal. *p=0.0159. (J) Estratégia de *gate*. Dados resultantes de um experimento biológico, mostrados como

Mediana \pm Intervalo interquartil (Controle, N=5; CI, N=5; camundongos fêmeas). Teste de Mann Whitney.

5.4.2 O polissacarídeo CI não é citotóxico e não altera a proliferação da linhagem RAW 264.7

Baseado no aumento da população CD11b⁺ previamente observado, o qual poderia indicar um aumento de monócitos/macrófagos (Shi e Pamer, 2011), assim como em resultados prévios de ativação de macrófagos exercidas pelo composto CI, buscou-se avaliar se o polissacarídeo induzia outros efeitos na linhagem RAW 264.7. Nas concentrações de 1, 10, 100 e 1000 $\mu\text{g/mL}$ por 72h, o composto CI não diminuiu a viabilidade celular avaliada pela captação do corante VN, assim como não alterou a densidade celular (Figura 22A e 22C). Na maior concentração, CI diminuiu a redução do corante MTT em 29,92% (Figura 22B).

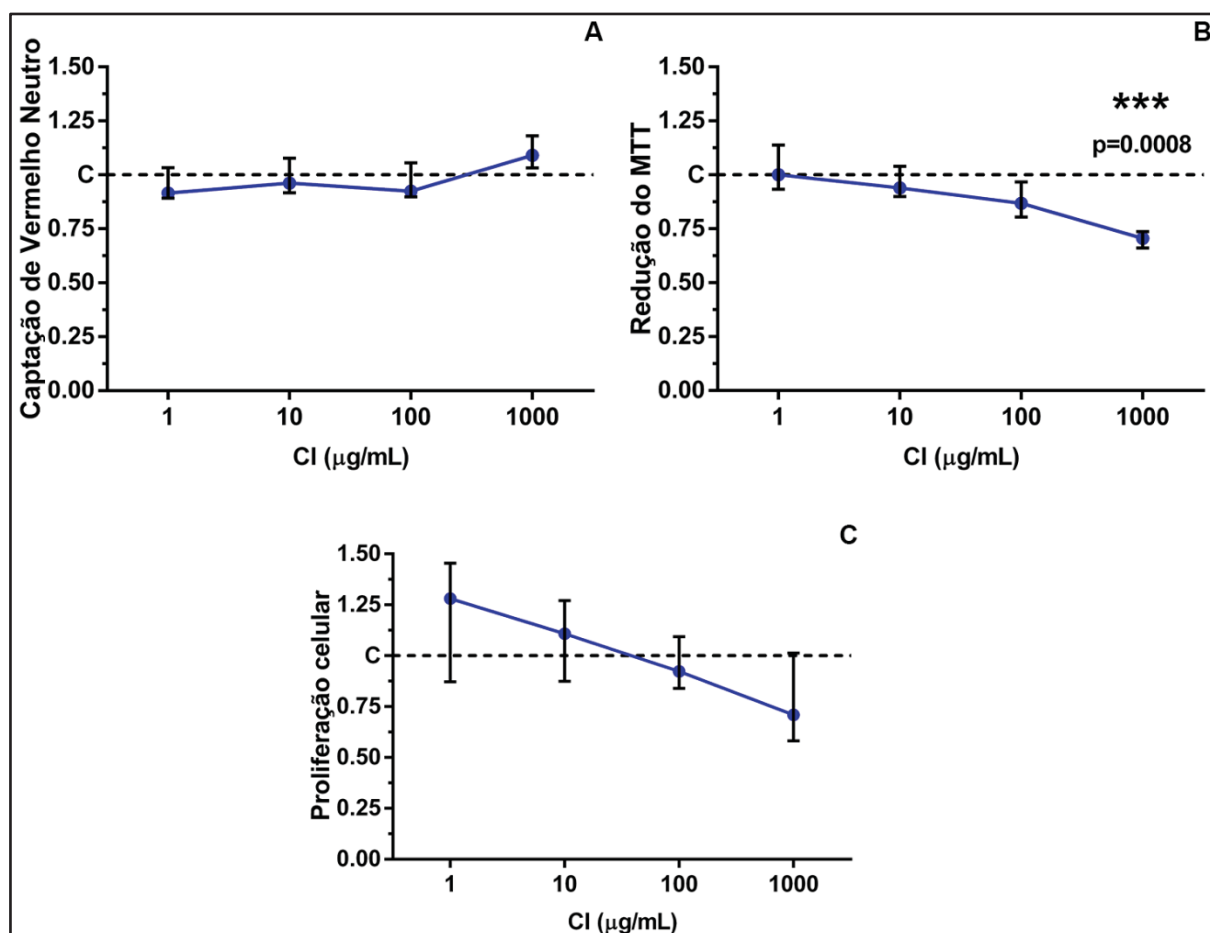


FIGURA 22 – VIABILIDADE E PROLIFERAÇÃO DA LINHAGEM RAW 264.7: O efeito do tratamento com CI nas concentrações de 1, 10, 100 e 1000 $\mu\text{g/mL}$ por 72h na linhagem RAW 264.7 foi avaliado quanto a sua citotoxicidade e alteração de proliferação. (A) Captação do corante Vermelho Neutro. (B) Redução do MTT. ***p=0.0008. (C) Proliferação celular. Dados resultantes de quatro experimentos biologicamente independentes com triplicata técnica em cada ensaio, mostrados como Mediana \pm Intervalo interquartil. Teste de Mann Whitney.

5.4.3 A capacidade fagocítica é aumentada após o tratamento com CI

A atividade fagocítica é uma das competências do sistema imune inato exercida principalmente por macrófagos ativados (Rosales e Uribe-Querol, 2017). Desta forma buscou-se avaliar se ocorre ativação da linhagem RAW 264.7 induzida por CI, através desta mecânica funcional das células. A capacidade fagocítica das células tratadas com 100 µg/mL de CI por 72h foi aumentada em 173,73% em relação ao grupo controle (Figura 23B).

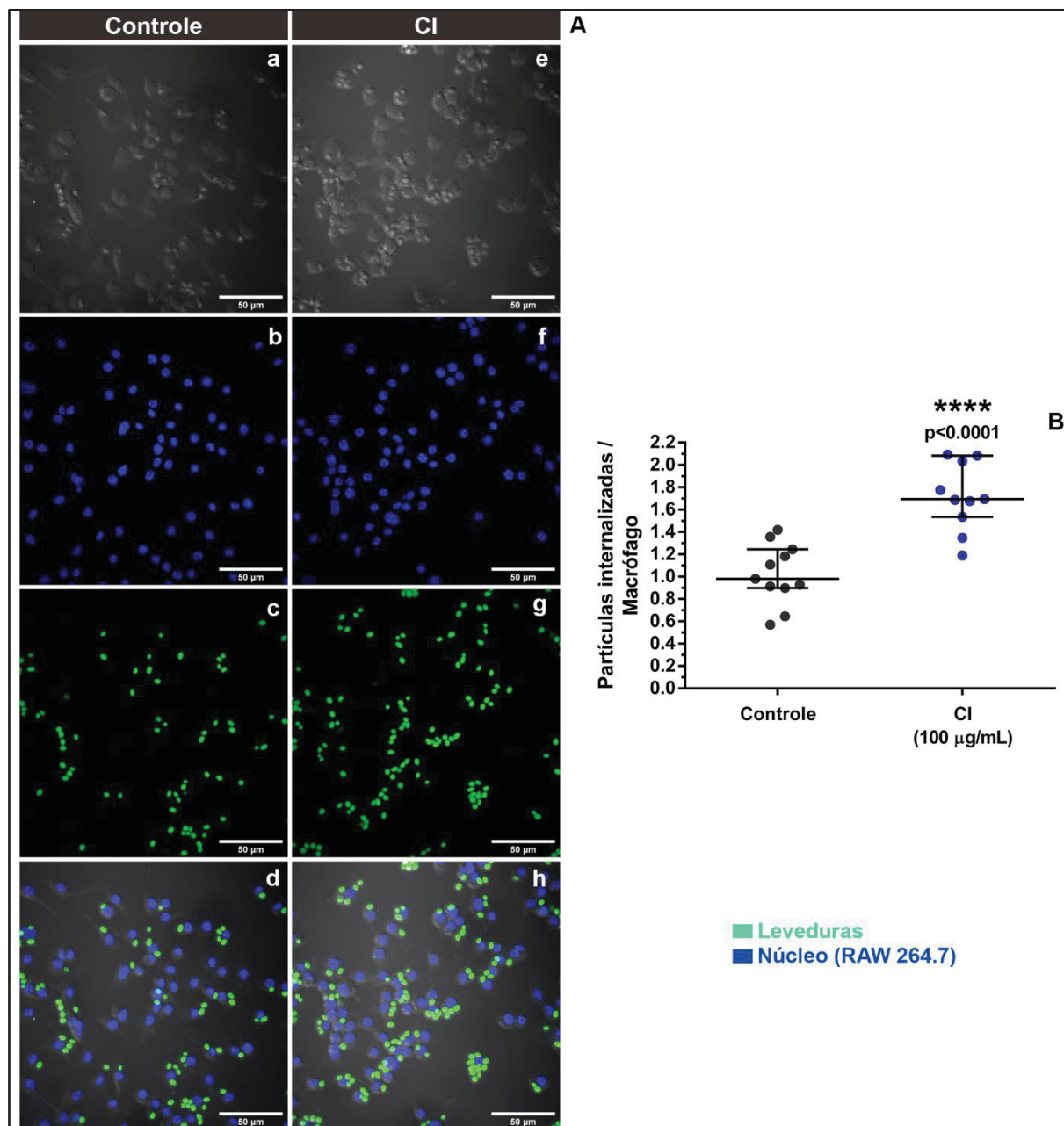


FIGURA 23 – ANÁLISE DA FAGOCITOSE CELULAR DE MACRÓFAGOS TRATADOS COM CI: A possível atividade imunomoduladora de aumento da fagocitose celular da linhagem RAW 264.7, frente ao tratamento com 100 µg/mL por 72h de CI foi avaliada. (A) Áreas representativas das lamínulas. Células (a-d) Controle. (e-g) tratadas com CI. (B) Partículas internalizadas / macrófago. ****p< 0.0001. Dados resultantes de dois experimentos biologicamente independentes com duplicata técnica em cada ensaio, mostrados como Mediana ± Intervalo interquartil. Teste de Mann Whitney.

5.4.4 As produções de MPC-1 e TNF são aumentadas após o tratamento com CI

Com base nos resultados prévios demonstrando ativação da linhagem RAW 264.7 com o composto CI, buscou-se determinar se essa atividade também resulta na modulação do perfil de produção de citocinas dessas células. A análise de citocinas do sobrenadante da cultura da linhagem RAW 264.7 após o tratamento por 24h com 100 µg/mL do polissacarídeo CI apresentou um aumento da produção de TNF e MCP-1 em relação ao grupo controle (Figura 24A). De forma semelhante, em 72h de tratamento TNF e MCP-1 apresentaram aumento estatisticamente significativo nos poços tratados com CI em relação ao grupo controle (Figura 24B).

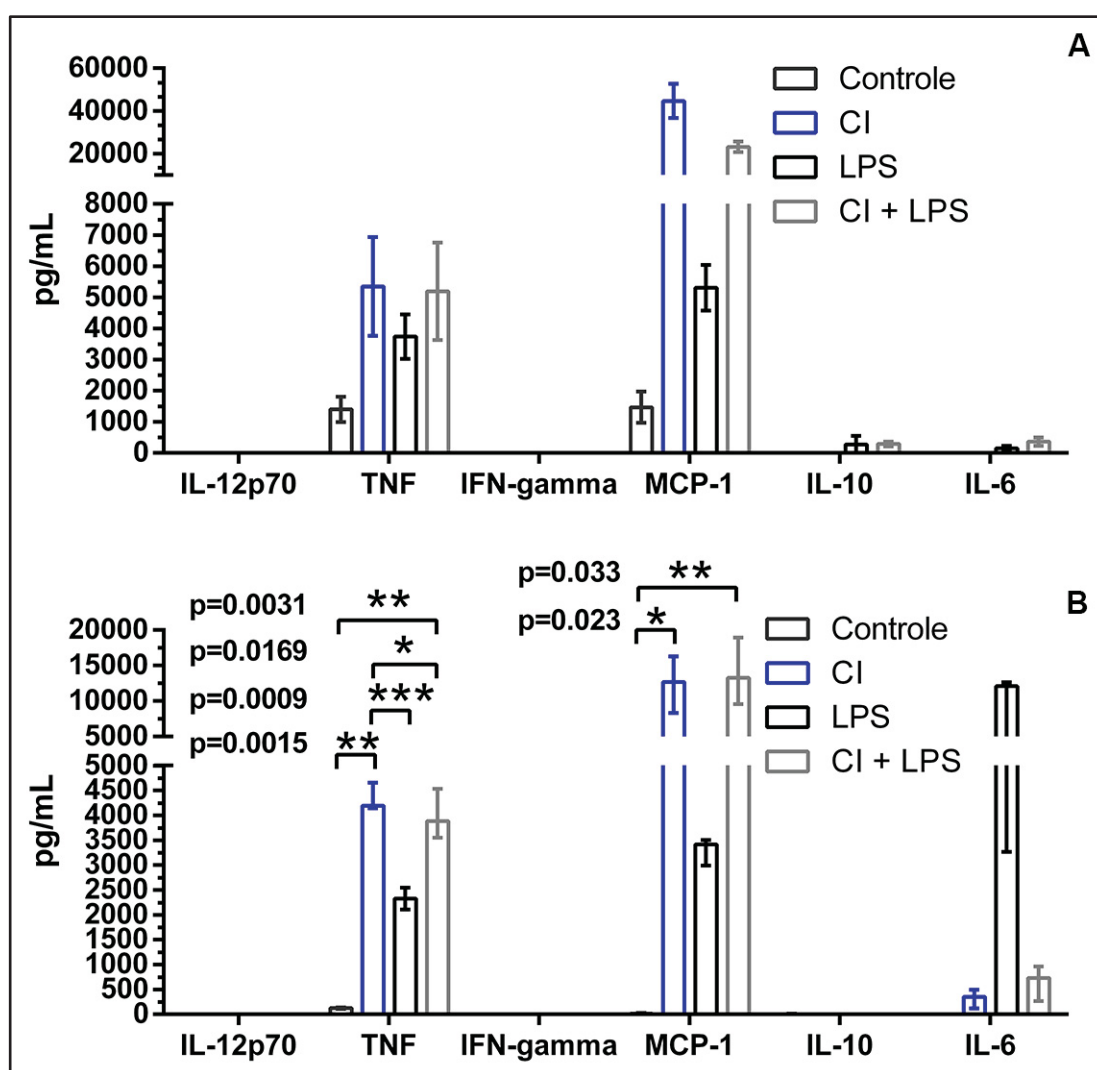


FIGURA 24 – ANÁLISE DA INTERFERÊNCIA DE CI SOBRE A PRODUÇÃO DE CITOCINAS *IN VITRO*: Possíveis alterações no perfil de citocinas produzidas pela linhagem RAW 264.7 após o tratamento com 100 µg/mL por 24 e 72h de CI foram avaliadas. (A) Citocinas pós 24h de tratamento. (B) Citocinas pós 72h de tratamento. Para TNF: $**p=0.0015$ (Controle x CI); $***p=0.0009$ (CI x LPS); $*p=0.0169$ (CI x CI+LPS); $**p=0.0031$ (Controle x CI+LPS). Para MCP-1: $*p=0.023$ (Controle x CI); $**p=0.033$ (Controle x CI+LPS). Dados resultantes de dois experimentos biologicamente independentes para 24h e três experimentos biologicamente independentes para 72h, mostrados como Mediana ± Intervalo interquartil. Teste de Mann Whitney.

5.4.5 CI também induz aumento de MCP-1 *in vivo*

O plasma de camundongos tratados com polissacarídeo CI e inoculados com a linhagem B16-F10 (24h de pré-tratamento com CI, seguido da inoculação de células e tratamento com o polissacarídeo por mais 24h) apresentou quantidades estatisticamente significativas maiores de MCP-1 do que o grupo controle (52,48%; Figura 25A). De forma semelhante, camundongos pré-tratados com CI por 24h, seguidos de inoculação de células e tratamento com o polissacarídeo por mais 72h apresentaram no plasma quantidades estatisticamente significativas maiores de MCP-1 do que o grupo controle (84,25%; Figura 25B).

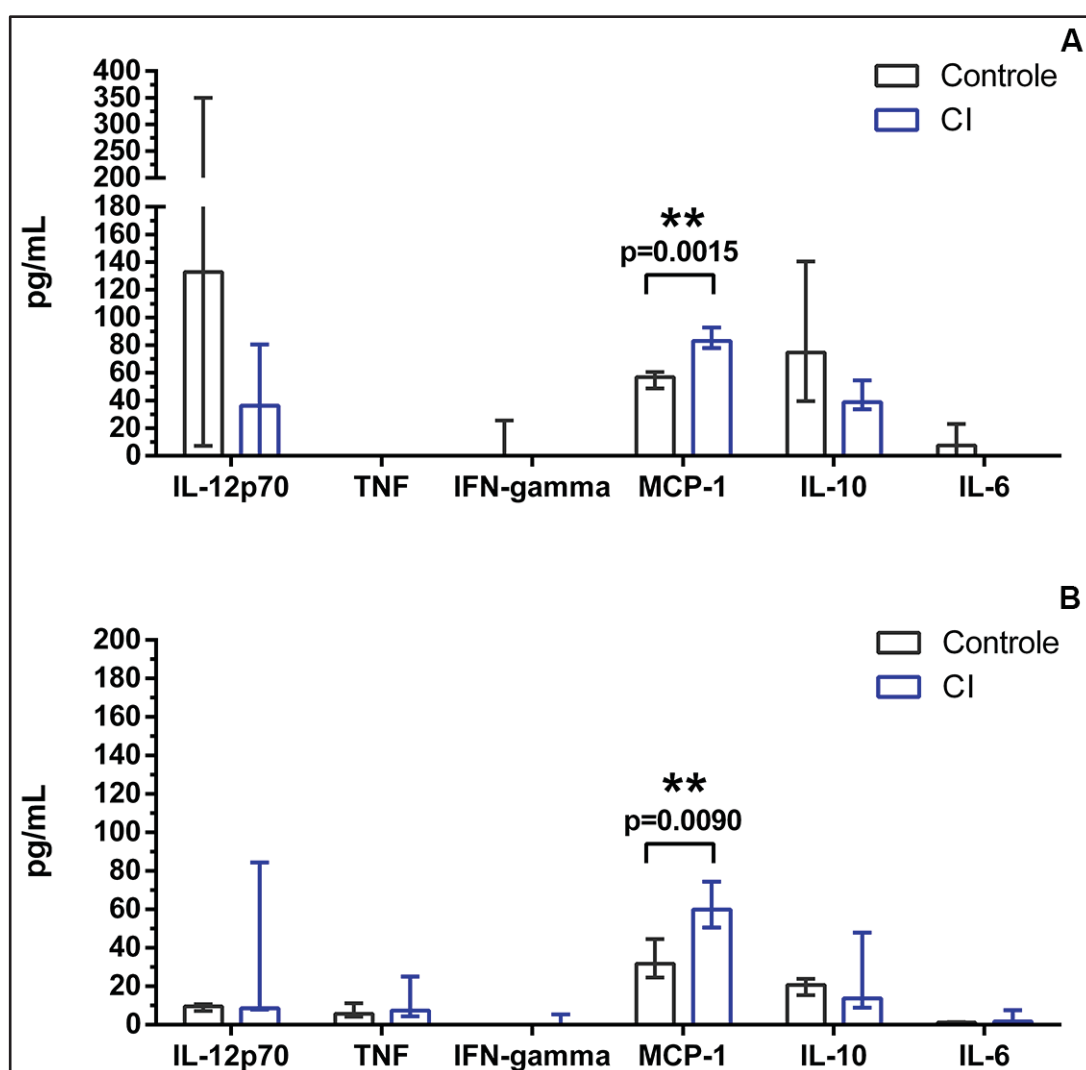


FIGURA 25 – ANÁLISE DA INTERFERÊNCIA DE CI SOBRE A PRODUÇÃO DE CITOCINAS *IN VIVO*: Possíveis alterações no perfil de citocinas obtidas do soro de camundongos tratados por 48h e 96h com CI foram avaliadas (inoculação de células B16-F10 24h após o início do tratamento). (A) Citocinas pós 48h de tratamento. ** $p=0.0015$ (B) Citocinas pós 96h de tratamento. ** $p=0.0090$. Dados resultantes de um experimento biológico mostrados como Mediana \pm Intervalo interquartil (para cada ensaio: Controle, N=4; CI, N=4; camundongos fêmeas). Teste de Mann Whitney.

5.4.6 A capacidade de *killing* de células NK obtidas de camundongos tratados com CI é aumentada

Células NK têm um papel fundamental na eliminação de células metastáticas (Rossi, Trindade e Souza-Fonseca-Guimaraes, 2020). Com base nas atividades antitumorais e imunomoduladoras observadas, buscou-se avaliar se o polissacarídeo CI induzia maior atividade de células NK. Células NK obtidas do baço de camundongos pré-tratados por 24h com CI, inoculados com a linhagem B16-F10 e tratados por mais 72h induziram significativamente mais morte celular na linhagem B16-F10 do que células obtidas do grupo controle. Células NK de camundongos tratados com CI induziram 18,67% de morte celular, enquanto células obtidas do grupo controle induziram 10,77% (Figura 26A).

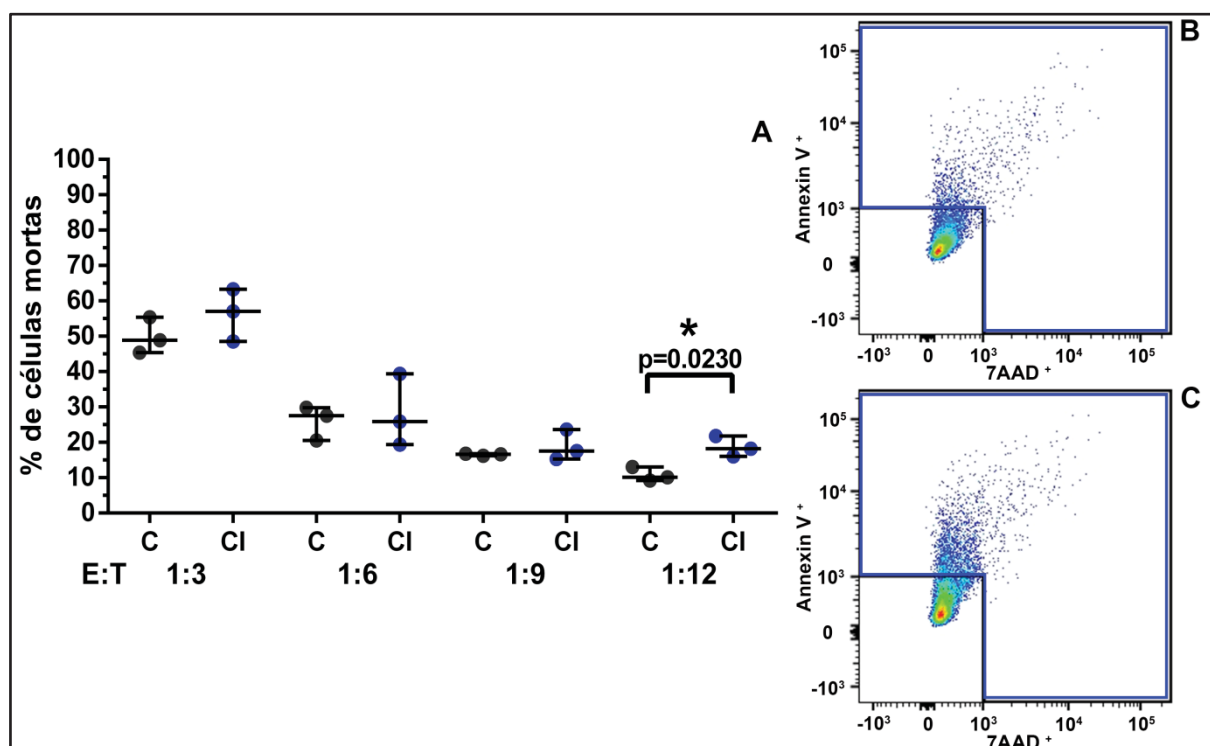


FIGURA 26 – ENSAIO DE KILLING: A capacidade do tratamento *in vivo* com CI de alterar a atividade de *killing* da linhagem NK foi avaliada empregando células B16-F10 como alvo. (A) Capacidade de *killing*. *p=0.0230. (B) Controle. (C) CI. (B) e (C) são dot-plots de morte celular representativos do ensaio. Dados resultantes de um experimento biológico mostrados como Mediana ± Intervalo interquartil (Controle, N=3; CI, N=3; camundongos fêmeas). Teste de Mann Whitney.

6. DISCUSSÃO

Nas últimas décadas o tratamento do melanoma metastático apresentou grandes avanços graças ao desenvolvimento e a combinação de terapias alvo e imunoterapias, gerando aumento de sobrevida dos pacientes. Apesar disso o estágio metastático do melanoma e de outros tipos de câncer continua a ser um grande desafio clínico, e os tratamentos hoje disponíveis são acompanhados de

efeitos colaterais debilitantes, adicionando mais uma camada de complexidade a esse panorama (Domingues *et al.*, 2018). Neste cenário de necessidade de busca de novos compostos que solucionem ou amenizem essa situação, polissacarídeos de fontes naturais sinalizam como uma possível opção.

Os primeiros ensaios *in vivo* do presente trabalho foram realizados empregando o modelo de tumor sólido, desenvolvido nos camundongos C57BL/6 através da inoculação subcutânea da linhagem de melanoma murino B16-F10. Este tipo de modelo, denominado singênico - em que a linhagem celular empregada é da mesma origem que o animal - é de grande relevância na pesquisa de novas drogas antitumorais desde 1950, e ainda é amplamente utilizado devido a sua fácil reprodutibilidade e a capacidade de avaliar as interações de um sistema imune funcional com as células tumorais, sendo de especial interesse na busca de novos compostos imunoterápicos atuantes no melanoma (Sharma *et al.*, 2015). A linhagem B16-F10 também é de grande valia quanto ao descobrimento de novas drogas, visto que ela não apresenta as duas mutações de ganho de função mais comuns no melanoma - *BRAF* e *NRAS* (Castle *et al.*, 2012) logo, tratamentos efetivos contra essa linhagem podem vir a superar as limitações impostas pelo panorama genético do melanoma metastático.

Uma das dificuldades em iniciar ensaios *in vivo* com novos compostos, logo de mecanismo de ação, farmacocinética, farmacodinâmica e biodistribuição desconhecidos, como é o caso de polissacarídeos, é a definição da dose: a falta de conhecimento sobre sua atividade e a ausência de semelhanças estruturais com drogas disponíveis no mercado impede o uso de extrapolações alométricas (Sharma e McNeill, 2009). Desta forma, os relatos na literatura quanto ao uso de outros polissacarídeos em ensaios *in vivo* foram utilizados como base de aproximação para determinação de doses.

As doses e os regimes de tratamento empregados variam enormemente na literatura de polissacarídeos, variando também com a via de administração, sendo que tratamentos por via intraperitoneal (como o empregado neste estudo) apresentam valores medianos quando comparados a via intravenosa (que apresenta menores valores) e a via oral (que apresenta os maiores valores). Em um modelo de tumor sólido da linhagem HT-29 em camundongos BALBc-*nude*, doses de 0.2, 1 e 5 mg/Kg de lentinan $\beta(1-3)$ D-glucose administradas via caudal por 21 dias de forma alternada foram suficientes para gerar diminuição do volume tumoral (Wang *et al.*,

2016). Utilizando valores bem maiores de tratamento, um estudo com o modelo de sarcoma-180 e avaliando a atividade antitumoral de uma fucana sulfatada obtida de *Ascophyllum nodosum*, empregou doses de 50 mg/Kg (intraperitoneal) e 500 mg/Kg (gavagem), com tratamento diário por 10 dias, também resultando em diminuição do volume tumoral (Jiang *et al.*, 2014). Em um estudo empregando um *range* de doses (50, 100 e 200 mg/Kg) administradas por via intraperitoneal com tratamento diário por 15 dias, um polissacarídeo obtido de *Achyranthes bidentata* no modelo de câncer de pulmão de Lewis em camundongos C57BL/6 diminuiu o volume tumoral de forma inversamente proporcional a dose, em que o menor valor administrado (50 mg/Kg) apresentou melhor efeito do que doses maiores (Jin *et al.*, 2007). Desta forma, os valores de doses empregados no presente estudo (50 e 100 mg/Kg) e a posterior seleção da dose de 50 mg/Kg enquadram-se na distribuição observada na literatura científica de polissacarídeos.

Dentro desse contexto e visto que a dacarbazina continua a ser o quimioterápico de escolha no tratamento do melanoma (Domingues *et al.*, 2018), buscamos avaliar a atividade conjunta desta droga com o polissacarídeo CI no modelo de tumor sólido induzido pela linhagem B16-F10. A administração sozinha do quimioterápico, bem como a administração da dacarbazina com CI reduziram significativamente o volume e peso tumoral, porém, não foi possível observar diferenças entre esses dois grupos. Além da possibilidade de o composto CI não ter um efeito aditivo ou sinérgico com a dacarbazina, outra possível explicação é a do uso de uma dose muito grande do quimioterápico (80 mg/Kg, diário, por 10 dias), o que resultou em tumores extremamente menores que o grupo controle, impossibilitando dessa forma a observação de qualquer efeito induzido pelo polissacarídeo CI. Apesar de ser possível achar esse mesmo valor de dose na literatura para o modelo de tumor sólido da linhagem B16-F10, o tratamento é feito por períodos mais curtos, de cinco dias (Malvi *et al.*, 2016). Doses menores também são utilizadas com eficácia no mesmo modelo tumoral, como 4.5 mg/Kg a cada dois dias (Faião-Flores *et al.*, 2015), 40 mg/Kg por 13 dias consecutivos (Zhang *et al.*, 2017), e 50 mg/Kg a cada três dias (Pencheva *et al.*, 2014). O estado de saúde dos animais tratados com Dtic também apresentou clara deterioração. Não foi possível observar diferenças entre esse estado nos grupos tratados apenas com Dtic e tratados com Dtic e CI, o que também poderia ser explicado pelo excesso na dose do quimioterápico usado, impedindo qualquer efeito protetor do polissacarídeo.

Logo, futuros experimentos buscando avaliar a atividade conjunta com esse quimioterápico devem ser feitos ajustando a dose dessa droga.

Ao repetir o modelo experimental de tumor sólido para comprovar a atividade antitumoral do composto na dose de 50 mg/kg, foi evidenciado que o polissacarídeo CI foi capaz de diminuir de forma estatisticamente significativa o peso, o volume tumoral final e o crescimento tumoral ao longo do tempo do modelo de melanoma empregado. Estes são efeitos promissores dado a alta agressividade e rápida proliferação da linhagem B16-F10 em modelos *in vivo*, devido em parte a sua baixa imunogenicidade (Seliger *et al.*, 2001), bem como do interesse em drogas capazes de retardar o avanço de tumores sólido inoperáveis, como pode ser o quadro de um paciente com melanoma (Nixon *et al.*, 2018; Perez *et al.*, 2019).

Polissacarídeos de fontes variadas já demonstraram atividades auxiliares em combinação com quimioterápicos (Zong, Cao e Wang, 2012), como diminuindo o volume e peso tumoral quando em combinação com docetaxel em modelo de melanoma murino induzido pela linhagem B16-F10 (Yang, Xu e Suo, 2015), com paclitaxel no mesmo modelo e apresentando o mesmo efeito, além de gerar aumento de sobrevida de camundongos inoculados com células da linhagem de sarcoma 180 (Shin *et al.*, 2004) e com ciclofosfamida, diminuindo o peso tumoral final de tumores sólidos de sarcoma 180 (Li *et al.*, 2011). A atividade conjunta de polissacarídeos com quimioterápicos é de tamanha relevância que essa abordagem já foi empregada em estudos clínicos: o polissacarídeo K, um complexo de polissacarídeo com proteínas, obtido do cogumelo *Trametes versicolor*, quando administrado em conjunto com fluorouracil em pacientes com câncer de colon metastático, gerou aumento de sobrevida (Ito *et al.*, 2004); no mesmo tipo de câncer, estudos clínicos empregando o polissacarídeo obtido da planta *Astragalus membranaceus* quando administrado em conjunto com fluorouracil aumentou a diminuição tumoral provocada pelo quimioterápico, bem como diminuiu os efeitos colaterais comumente observados (Lin *et al.*, 2019).

A cada dez pacientes que morrem em decorrência do câncer, nove óbitos ocorrem devido à progressão do processo metastático (Lambert, Pattabiraman e Weinberg, 2016), etapa na qual os tratamentos atualmente disponíveis são pouco eficazes, visto o acúmulo de características fenotípicas vantajosas e a grande heterogeneidade celular das células que completam com sucesso os complexos passos da metástase (Steeg, 2016). Devido a sua alta taxa de mutação, o

melanoma é um tipo de câncer que rapidamente progride para a invasão tecidual e colonização de novos tecidos e órgãos (Moran *et al.*, 2017), drasticamente reduzindo a sobrevida dos pacientes (Hartman e Lin, 2019). Nesse contexto e com base nos promissores resultados prévios de redução da progressão do tumor sólido frente ao tratamento com CI, buscamos avaliar se o polissacarídeo também exerceria atividade antimetastática, simulando parte do processo empregando o modelo de metástase experimental.

Diferentes abordagens *in vitro* podem ser empregadas para estudar os passos da cascata metastática, como os ensaios de migração e invasão, a capacidade de formação de colônias e a degradação de substratos por metaloproteinases (Menyhárt *et al.*, 2016). Da mesma forma, modelos de metástase *in vivo* são amplamente utilizados, como ensaios empregando camundongos geneticamente modificados à predisposição de surgimento de metástases em tecidos específicos, modelos de transplante de tumores primários pré-formados e de inoculação de células tumorais por diferentes vias, como a veia lateral caudal ou via intracardiaca. O modelo empregado no presente trabalho é comumente denominado de metástase experimental, também chamado de metástase pulmonar. Esse tipo de modelo é amplamente utilizado devido a sua rapidez a atingir os estágios finais do desenvolvimento tumoral, seu baixo custo em relação a outros e à sua reprodutibilidade laboratorial. Células inoculadas na veia caudal do animal ficam retidas, em sua grande maioria, na rede de capilares dos pulmões, colonizando a região e originando tumores sólidos. Apesar de mimetizar apenas as etapas finais do processo metastático, tal desenho experimental permite a avaliação de eventos importantes, como a interação das células tumorais com o sistema imune do animal (quando feito de forma singênica), o extravasamento da circulação sanguínea pelas células malignizadas e a colonização desta região (Gómez-Cuadrado *et al.*, 2017).

O pré-tratamento com CI por 24h seguido da inoculação das células tumorais e então tratamento diário até o final do experimento resultou em diminuição da formação de tumores nos pulmões – em 10, 16 e 21 dias - e em outros órgãos – como mostrado pelo IVIS, em 16 dias. A diminuição do peso dos pulmões dos animais tratados em relação ao grupo controle no experimento de maior duração também pode apontar um efeito antitumoral, visto que o aumento de peso desse órgão dentro da patologia está associado à progressão tumoral (Viswanath *et al.*, 2018). Apesar dos pulmões serem o principal órgão de localização dos tumores

formados no modelo de metástase experimental, a inoculação de células B16-F10 pela veia caudal de camundongos C57BL/6 pode originar tumores em outros órgãos e tecidos, inclusive nos ossos (Winkelmann *et al.*, 2006), o que mostra a relevância do uso do sistema IVIS e outros equipamentos de imageamento semelhantes, que permitiu no presente trabalho constatar essa distribuição e apontar mais um resultado antitumoral exercido pelo polissacarídeo CI.

Outros polissacarídeos sulfatados apresentam atividade antitumoral semelhante (Khan *et al.*, 2019), como um heteropolissacarídeo sulfatado obtido da alga *Ascophyllum nodosum*, administrado por via intraperitoneal na dose de 25 mg/Kg 24h após a inoculação intravenosa de células B16-F10 em camundongos C57BL/6 (Abu *et al.*, 2015). Porém, após extensa procura na literatura, é possível verificar que os resultados antitumorais aqui apresentados são os primeiros relatos de uma homogalactana obtida de alga verde exercendo atividade antitumoral em modelos de melanoma *in vivo*, expandindo dessa forma os conhecimentos sobre a atividade desses compostos. O modelo de pré-tratamento empregado no presente trabalho também difere dos previamente citados, mas apresenta um fluxo lógico dentro da evolução da patologia: um paciente com tumor primário pode passar a fazer uso do polissacarídeo para diminuir a progressão do tumor sólido, portanto o composto já vai estar presente antes da formação dos focos metastáticos, e dado as diferentes atividades imunomodulatórias já descritas para polissacarídeos, CI poderia atuar aumentando a atividade de células NK, macrófagos e linfócitos T, os quais sabidamente podem atuar na eliminação de células metastáticas (Janssen *et al.*, 2017).

Uma das primeiras abordagens no tratamento do câncer foram drogas citotóxicas, denominados quimioterápicos, capazes de induzir danos ao DNA de células em divisão e consequente morte celular, sendo pouco seletivos e com grandes efeitos colaterais devido a seu mecanismo de ação (Falzone, Salomone e Libra, 2018). A literatura de polissacarídeos também mostra compostos que exercem parte de sua atividade antitumoral devido à citotoxicidade, induzindo a ativação de caspases e/ou despolarizando a membrana mitocondrial e levando à apoptose celular (Khan *et al.*, 2019). Vários polissacarídeos sulfatados obtidos de algas e que apresentam galactana em sua composição também induzem citotoxicidade e apoptose em diferentes linhagens tumorais, como na linhagem B16-F10 (Ale *et al.*, 2011), em células HT-29 de câncer de cólon (Kim *et al.*, 2007) e em linhagens de

câncer de ducto biliar humano (Sae-Lao *et al.*, 2017). Apesar dessa tendência, nosso grupo de pesquisa vem demonstrando que compostos sulfatados não citotóxicos podem modular outras dinâmicas malignizadas de linhagem tumorais, como as da B16-F10, diminuindo sua capacidade migratória e invasiva (Bellan, Mazepa, E., *et al.*, 2020) e reduzindo a progressão tumoral *in vivo* sem induzir efeitos colaterais detectáveis (Biscaia *et al.*, 2017). Resultados anteriores com o polissacarídeo CI já demonstraram sua ausência de citotoxicidade *in vitro* (Bellan, D. de L., 2016). Desta forma, buscou-se avaliar se o tratamento *in vivo* com CI após diferentes tempos de administração induziu efeitos colaterais, avaliando parâmetros como o peso corporal e dos órgãos dos animais, bem como fazendo uso de análises bioquímicas e hemograma.

O peso do baço dos animais apresentou aumento em vários dos regimes de tratamento empregados, e esse efeito foi explorado empregando a imunofenotipagem, a qual será posteriormente discutida. Após 96h e 21 dias de tratamento com CI, em camundongos inoculados com a linhagem B16-F10, o peso do fígado dos animais tratados foi significativamente maior, assim como também evidenciado no conjunto de dados obtidos nos quatro experimentos empregando o modelo de tumor sólido. Apesar desse aumento, todas as análises bioquímicas não indicaram hepatotoxicidade, como demonstrado pelos níveis de alanina aminotransferase e aspartato aminotransaminase. Da mesma forma, nenhum outro parâmetro bioquímico e nenhuma das análises de hemograma em nenhum dos tempos analisados indicou efeitos colaterais na saúde geral dos camundongos. No experimento de metástase experimental de maior duração (21 dias), os camundongos do grupo tratado apresentaram ganho de peso em relação ao início do experimento, enquanto que os animais controle perderam peso. Este resultado pode ser um indicativo de um efeito protetivo do CI contra a caquexia, uma comum consequência do câncer que leva a perda de tecido muscular esquelético e progressiva perda de movimentos (Fearon *et al.*, 2011). Efeitos protetivos semelhantes já foram descritos para outros polissacarídeos (Chen *et al.*, 2018; Fitton *et al.*, 2019). O tratamento contra o câncer é normalmente acompanhado de muitos efeitos colaterais, induzindo uma severa perda de qualidade de vida do paciente e até mesmo o abandono da terapia (Clarke *et al.*, 2015), aumentando o interesse por compostos antitumorais com reduzida toxicidade, como potencialmente demonstrado pelo polissacarídeo CI.

A ausência de citotoxicidade indica que atividade antitumoral do polissacarídeo é exercida por outras modulações biológicas nas células malignizadas e/ou de forma sistêmica, como por exemplo, pelo sistema imune do camundongo.

O tratamento da linhagem B16-F10 com CI resultou em maior adesão das células sobre matrigel, diminuiu a capacidade invasiva através desta mesma matriz e reduziu a marcação de glicoconjugados na superfície celular.

A EMT inicia-se antes do processo metastático, ainda no microambiente tumoral, alterando as dinâmicas que envolvem as interações homotípicas (entre células malignizadas) e heterotípicas (entre células malignizadas e as demais células do microambiente), bem como a comunicação da célula tumoral com a MEC, o que induz perda de polaridade celular e da estrutura tecidual, estando associada a progressão de cânceres de origem epitelial, promovendo aumento de proliferação e capacidade migratória (Farahani *et al.*, 2014; Hirohashi, 1998), através da alteração do perfil de expressão dos receptores de adesão celular e da clivagem dos mesmos por metaloproteínases, como no melanoma, em que a perda de E-caderina e aumento da expressão de N-caderina e integrina $\alpha_5\beta_3$ auxiliam as capacidades invasivas e metastáticas das células tumorais (Janiszewska, Primi e Izard, 2020; McGary, Chelouche Lev e Bar-Eli, 2002). A alteração da adesão celular durante a progressão tumoral ocorre via diferentes receptores e é acompanhada da ativação de vias de sinalização que promovem a sobrevivência da célula nos períodos de baixa adesão, uma dinâmica que precisa ser altamente controlada para também assegurar a motilidade das células, sendo que interações de adesão muito fracas ou muito fortes resultam em baixa capacidade migratória (Ananthakrishnan e Ehrlicher, 2007; Janiszewska, Primi e Izard, 2020). Nesse contexto alguns estudos exploraram o aumento da adesão como forma de inibir a migração celular e a capacidade metastática, como através do uso de nanopartículas *in vitro* (Abduljauwad e Ahmed, 2019) e de curcumina, também *in vitro* (Zheng *et al.*, 2018). Extratos contendo polissacarídeos obtidos dos cogumelos *Grifola frondosa* e *Trametes versicolor* diminuíram a capacidade de formação de colônias, a migração e a invasão de células de câncer de colorretal humano (linhagem LoVo), efeito possivelmente relacionado ao aumento da expressão de E-caderina também observado (Roca-Lema *et al.*, 2019).

Desta forma, o aumento de adesão visto após o tratamento com CI pode fazer parte dos efeitos que geraram os resultados *in vivo* observados, induzindo aumento da adesão célula-célula e célula-matriz, reduzindo assim o crescimento do tumor sólido. No experimento de metástase experimental a colonização dos tecidos também pode estar sendo afetada pela atividade do CI nas interações de adesão das células e da matriz necessárias para remodelar e colonizar o tecido pulmonar. Esses efeitos poderiam ser resultado de alteração da expressão de receptores de superfície celular, como a E-caderina, porém a análise de expressão gênica e a quantificação de proteínas do tecido seriam necessárias para fundamentar essa afirmação. É relevante destacar que o efeito de aumento da adesão induzido por CI foi causado pelo pré-tratamento das células no experimento *in vitro*, o que não ocorre no modelo *in vivo*. Porém é possível observar na literatura que um efeito do tratamento desencadeado pela administração de um composto no animal ao longo do tempo pode afetar as dinâmicas de adesão e consequentemente a cascata de progressão do processo metastático. Camundongos inoculados pela veia caudal com a linhagem de câncer de mama 4T1 foram tratados 24h após a inoculação celular com anticorpos monoclonais que ligam-se a E-caderina, apresentando resultados de diminuição da formação de tumores primários nos pulmões, além de diminuição da migração e invasão dessas células *in vitro* bem como do aumento da adesão celular (Na *et al.*, 2020).

Grande parte da progressão tumoral e do sucesso do processo metastático dependem da capacidade de remodelamento e degradação da MEC, executado principalmente pela atividade das proteinases – MMPs e ADAMs (Gonzalez-Avila *et al.*, 2019; Kessenbrock, Plaks e Werb, 2010). O processo invasivo possibilitado por essa degradação vai permitir o acesso aos capilares sanguíneos, a intravasão na circulação e posteriormente a extravasão e colonização (Cox *et al.*, 2018).

Modelos *in vitro* que simulam a invasão celular são amplamente empregados, permitindo analisar a capacidade das células em transpor uma barreira de matriz, como o matrigel (Kramer *et al.*, 2013). Atividades de redução da capacidade migratória e invasiva de linhagens tumorais, bem como diminuição da expressão e atividade de MMPs e consequente redução da formação de tumores primários nos pulmões são descritas na literatura como modulações desencadeadas por polissacarídeos (Khan *et al.*, 2019; Zong *et al.*, 2013). Desta forma, o resultado de redução da invasão celular *in vitro* induzida após o tratamento com CI pode estar

relacionada a parte dos resultados *in vivo* observados, através por exemplo da diminuição da expressão ou atividade de proteinases. A análise da expressão de MMPs e sua atividade gelatinolítica poderiam ser realizadas para embasar essa hipótese. Outra possibilidade que poderia explicar parte da redução da invasão celular é o aumento da adesão, o que diminuiria a motilidade celular, resultando assim em células menos invasivas.

O tratamento com CI diminuiu a marcação de glicoconjugados na superfície celular, sendo que parte dessa redução esta possivelmente associada à diminuição de glicoconjugados contendo N-acetilglucosamina e ácido silálico devido à especificidade da lectina WGA (Bhavanandan e Katlic, 1979). A alteração no padrão de glicosilação é observada no câncer, promovendo aumento de sinais proliferativos, resistência a morte celular, evasão do sistema imune, migração e invasão (Peixoto *et al.*, 2019). A adição de ácido siálico nessas moléculas aumenta a motilidade e invasão celular através da disrupção tecidual e diminuição da adesão devido ao aumento de cargas negativas na superfície celular, além de alterar a atividade de receptores de adesão celular, como as integrinas; o aumento de sialilação também atua no processo metastático ao proteger as células do reconhecimento e eliminação pelo sistema imune (Läubli e Borsig, 2019; Li e Ding, 2019). A diminuição da sialilação vem sendo explorada como possibilidade terapêutica (Pearce e Läubli, 2015), como através da inibição da sialiltransferase com o uso de um análogo do ácido siálico (P-3F_{ax}-Neu5Ac) reduzindo a formação de nódulos pulmonares em camundongos inoculados com a linhagem B16-F10 (Büll *et al.*, 2015). A redução da marcação de glicoconjugados observada após o tratamento com CI pode desta forma explicar parte dos resultados observados, mas deve ser explorada mais a fundo buscando por exemplo quantificar a presença desses compostos na superfície celular, o que viria a demonstrar uma possível modulação de expressão ou atividade das enzimas associadas à glicosilação e a sialilação.

O resultado previamente observado de diminuição da formação de colônias de forma ancoragem-independente em células tratadas com CI também pode explicar os dados *in vivo* aqui demonstrados. Após a extravasão das células metastáticas no tecido alvo, o sucesso da cascata metastática depende da capacidade celular de sobreviver e colonizar esse novo microambiente, normalmente auxiliado por fatores inflamatórios e de crescimentos previamente liberados pelo tumor primário, formando um nicho pré-metastático (Pachmayr,

Treese e Stein, 2017). A formação de micro e macro metástases depende neste ponto de uma alta capacidade proliferativa independente de interações homotípicas entre as células, traço parcialmente simulado em ensaios de colonização (Franken *et al.*, 2006).

Como observado na bioluminescência obtida pelo IVIS no experimento de metástase experimental, 2h após a inoculação de células não é possível observar diferenças na distribuição celular entre os grupos controle e tratado. Na captura seguinte, nove dias após a inoculação, é evidente a menor quantidade de bioluminescência, e consequentemente de células, nos grupos tratados, indicando uma possível atividade antitumoral nos primeiros dias do ensaio. Interessantemente, os resultados *in vitro* aqui descritos podem ter um paralelo com os primeiros três dias da metástase experimental, que são o rápido transito pela circulação sanguínea, a adesão inicial e fixação e a extravasão e colonização inicial (Labelle e Hynes, 2012). O tratamento *in vivo* com CI, administrado nos animais 24h antes da inoculação das células, pode estar interferindo com a extravasão e colonização inicial, devido a diminuição da motilidade e da capacidade invasiva e remodelamento da MEC; a redução em glicoconjugados pode estar afetando a capacidade proliferativa das células, bem como as tornando mais visíveis para eliminação pelo sistema imune; por fim, a redução da capacidade de proliferação de forma independente de ancoragem pode estar afetando a subsequente proliferação celular necessária para a colonização tecidual.

O crescimento de tumores primários e a progressão metastática dependem da circunvenção do sistema imune (Dunn, Old e Schreiber, 2004), o que recentemente levou a busca de drogas capazes de aumentar a capacidade desse em reconhecer e eliminar células tumorais, a chamada imunoterapia, apresentando expressivos resultados em cânceres altamente imunogênicos, como o melanoma (Lugowska, Teterycz e Rutkowski, 2018; Passarelli *et al.*, 2017). Entre as barreiras impostas pelo sistema imune contra o desenvolvimento tumoral estão células NK, linfócitos T CD8⁺ e macrófagos classicamente ativados (polarização M1), as quais têm a capacidade de diretamente induzir a morte de células malignizadas e produzir citocinas incitando a resposta antitumoral (Janssen *et al.*, 2017; Najafi, Hashemi Goradel, *et al.*, 2019). Diversos polissacarídeos apresentam atividade imunomoduladora, promovendo respostas pró e anti-inflamatórias, ativando linfócitos e macrófagos (Manlusoc *et al.*, 2019), modificando o perfil de citocinas em

macrófagos (MAEDA *et al.*, 2012) e promovendo aumento do peso do baço de animais tratados – decorrente de proliferação de linfócitos (Jiao *et al.*, 2010). Polissacarídeos sulfatados obtidos de algas do gênero *Codium* também já foram descritos como imunomoduladores, aumentando a proliferação e capacidade de *killing* de células NK contra a linhagem HeLa (Surayot e You, 2017) e induzindo a produção de óxido nítrico e citocinas (Lee *et al.*, 2010). Tendo em vista o papel do sistema imunológico nas etapas iniciais do processo metastático, o suporte na literatura apontando para a atividade imunomoduladora dos polissacarídeos e o aumento recorrente do baço dos animais tratados com CI nos ensaios *in vivo*, foram realizados experimentos buscando avaliar a atividade do composto em pontos específicos do sistema imune e sua possível relação com a atividade antitumoral observada.

A imunofenotipagem dos baços obtidos de camundongos tratados diariamente com CI por 10 dias foi realizada, revelando um aumento da população CD11b+ e uma diminuição da população CD11b+Ly6C+ e da população CD3+

O Cluster de Diferenciação 11b (CD11b) é um marcador comumente usado para reconhecimento de monócitos precursores de macrófagos e células dendríticas (DC). Monócitos são gerados a partir de células hematopoiéticas na medula óssea, migrando então para tecidos dando origem a populações residentes de macrófagos e DCs que mantêm a homeostase tecidual. Em processos inflamatórios a mobilização e o recrutamento de monócitos para os tecidos é amplamente aumentada, e uma vez no tecido essas células respondem a estímulos do microambiente dando origem a uma grande diversidade de fenótipos e funções, podendo auxiliar no desenvolvimento da resposta imune inata e adaptativa. Entre as subpopulações originadas, macrófagos pró-inflamatórios Ly6C^{high} e macrófagos “patrulheiros” (os quais migram constantemente ao longo da superfície de células endoteliais) Ly6C^{low} são as mais comuns em camundongos (Richards, Hettinger e Feuerer, 2013; Shi e Pamer, 2011).

A diminuição da população CD11b+ Ly6C+ resultante do tratamento com CI pode vir a ser vista como positiva, uma vez que esses marcadores são parte da caracterização de uma população de monócitos imunossupressora e pró-tumoral (Canè *et al.*, 2019), porém outros marcadores de superfície celular precisam ser usados para de fato confirmar a caracterização dessa população celular.

O aumento de monócitos (e potencialmente macrófagos) causado pelo tratamento com o polissacarídeo CI em um modelo *in vivo*, bem como os resultados antitumorais já observados, inicialmente aparentam uma contradição: macrófagos associados ao tumor (TAM) constituem a maior parte desse tipo celular no infiltrado de células do sistema imune dentro do microambiente tumoral, sendo recrutados da corrente sanguínea e dos tecidos e polarizados para um fenótipo pró-tumoral, auxiliando a progressão do tumor em vários estágios (Yang e Zhang, 2017). Porém, macrófagos também podem adotar um fenótipo antitumoral, o qual poderia estar sendo induzido pelo tratamento com CI. Macrófagos com a polarização M1 são células pró-inflamatórias que, no contexto do câncer, promovem atividade antitumoral (Najafi, Hashemi Goradel, *et al.*, 2019). Esta vem sendo explorada na imunoterapia. Um dos principais alvos é a proteína transdutora de sinal fosfoinositol 3 quinase (PI3Ky), a qual atua *downstream* de diversas citocinas e promove alteração do fenótipo imuno estimulatório para imuno supressivo. Níveis de expressão reduzidos dessa proteína e sua inibição geram maior sobrevida de pacientes com câncer de pulmão de não pequenas células (*non small cell lung cancer*), HPV e câncer de pescoço e cabeça (Kaneda *et al.*, 2016; Pathria, Louis e Varner, 2019). Em melanoma, empregando o modelo de tumor sólido desenvolvido com a linhagem B16-F10, Jarosz-Biej e colaboradores (2018) promoveram a repolarização de macrófagos M2 para M1 utilizando a administração de um composto anti-angiogênico (endoglin, uma glicoproteína co-receptora de fatores de crescimento presente principalmente em endotélios) e IL-12. A análise da expressão gênica de macrófagos no infiltrado tumoral revelou aumento da expressão de genes associados a ativação M1 (iNOS, IL-1b, CXCL-9 e IL-12a) e diminuição da expressão de genes associados à polarização M2. Os tumores dos animais tratados apresentaram significativa diminuição de crescimento, além de aumento do infiltrado de macrófagos M1, células T e NK. A depleção de macrófagos eliminou o efeito antitumoral promovido pelo tratamento. Por fim, a vascularização dos tumores dos animais tratados apresentou maior estruturação, o que demonstra outro efeito da diminuição de macrófagos M2, uma vez que estes promovem angiogênese de vasos pouco definidos, resultando em baixa perfusão dos tratamentos empregados (Jarosz-Biej *et al.*, 2018). A mudança de polarização de macrófagos de M2 para M1 bem como as propriedades pró-inflamatórias das células M1 também vem sendo exploradas via partículas sintéticas, apresentando resultados promissores em

modelos tumorais *in vivo* (Shields IV *et al.*, 2020) e até mesmo no contexto da terapia do receptor de antígeno quimérico (CAR-T, para células T, e CAR-M, como denominado pelos autores para macrófagos) (Klichinsky *et al.*, 2020).

A teoria de polarização M1 induzida pelo polissacarídeo CI pode ser sustentada na literatura, a qual possui vários relatos de compostos induzindo características desse fenótipo de ativação. Wei e colaboradores (2019) mostram o aumento da expressão dos genes iNOS, IL-6, TNF- α e CXCL10 (marcadores de polarização M1) em macrófagos derivados da medula óssea de camundongos Balb/c tratados *in vitro* com polissacarídeos obtidos da planta *Radix astragali* nas concentrações de 30, 100 e 300 $\mu\text{g/mL}$. Em um modelo de tumor de mama *in vivo* desenvolvido com a linhagem 4T1, a inoculação na glândula mamária de animais Balb/c conjunta das células tumorais com macrófagos pré-tratados com esse polissacarídeo resultou em significativa diminuição do desenvolvimento tumoral (Wei *et al.*, 2019). Liu e colaboradores (2017) mostram a atividade imunomoduladora dos polissacarídeos obtidos do fungo *Polyporus umbellatus* na linhagem RAW 267.4. O tratamento com 250 $\mu\text{g/mL}$ de macrófagos estimulados com IFN- α aumentou a produção de óxido nítrico, IL-6 e TNF- α , além de promover aumento da atividade fagocítica (Liu *et al.*, 2017). Diversos polissacarídeos de algas marinhas também apresentam atividade imunoestimulatória e pró-inflamatória em macrófagos (Raposo, Morais e Morais, 2015) e também em galactanas sulfatadas, promovendo a conversão do fenótipo M2 para M1 com consequente aumento de expressão de iNOS, TNF- α e IL-6 (Meng *et al.*, 2019) e promovendo redução de tumores sólidos da linhagem B16-F10 com observado aumento de infiltrado de macrófagos M1 no microambiente tumoral (Luo *et al.*, 2015), sendo este um composto estruturalmente semelhante ao polissacarídeo CI (homogalactana sulfatada) com similar atividade antitumoral. Por fim, mais de 80 estudos em fase de testes clínicos, muitos deles em oncologia, estão sendo desenvolvidos empregando β -glucanas de diferentes fontes, como fungos, algas e plantas, as quais apresentam diversas modulações no sistema imune inato e adquirido, atuando em células B e T, NKs, DCs e macrófagos, promovendo nestas modulações de polarização M1, induzindo resposta Th1, aumentando a produção de citocinas pró-inflamatórias, expressão de iNOS e produção de óxido nítrico (Bashir e Choi, 2017; Vetvicka *et al.*, 2019).

Dado a possibilidade do tratamento com CI estar modulando macrófagos e a importância do perfil de citocinas na determinação da resposta imune exercida,

buscou-se avaliar efeitos *in vitro* do composto na linhagem de macrófagos murinos RAW 264.7 bem como a análise da produção de citocinas.

O polissacarídeo CI não diminuiu a captação de Vermelho Neutro nem a proliferação da linhagem RAW 264.7, mas na maior concentração induziu diminuição na redução de MTT, efeito o qual não foi suficiente para ser determinado como citotoxicidade, visto que foi menor do que 30% (ISO 2009). Esse resultado corrobora com os dados previamente obtidos na linhagem B16-F10, indicando um composto que não interfere com a viabilidade celular.

O tratamento *in vitro* com CI aumentou a capacidade fagocítica dos macrófagos, representando a modulação de uma dinâmica celular essencial da resposta imune inata, sendo que essa é executada majoritariamente por macrófagos, participando assim da eliminação de patógenos e células apoptóticas para manutenção da homeostase tecidual (Hirayama, Iida e Nakase, 2018; Rosales e Uribe-Querol, 2017). Esse resultado corrobora com a prévia observação de aumento da produção de espécies reativas de oxigênio na linhagem RAW 264.7 induzida por CI, visto que essas moléculas participam do início e da resolução do processo fagocítico (Bellan, D. de L., 2016; Tan *et al.*, 2016).

O tratamento *in vitro* por 72h com o polissacarídeo CI aumentou significativamente a produção de TNF e MCP-1. O tratamento de camundongos por 48h e 96h com CI inoculados com a linhagem B16-F10 (sendo destes períodos 24h de pré-tratamento antes da inoculação celular) resultou em aumento significativo da produção de MPC-1 detectado no soro dos animais.

O Fator de Necrose Tumoral (TNF) faz parte de uma grande família de citocinas constituída de TNF- α , TNF- β , CD40 ligante, Fas ligante e TNF ligante associado a apoptose (TRAIL), produzidas principalmente por macrófagos (Chu, 2013). A compreensão da atividade necrótica associada ao TNF veio de Carswell e colaboradores, em 1975, ao demonstrar que os resultados obtidos por Coley em 1890 com endotoxinas bacterianas eram na verdade o resultado da produção dessa citocina por células do sistema imune dos pacientes, e não das endotoxinas em si. Atualmente as estratégias terapêuticas envolvendo TNF apresentam dualidade de resultados e muitos efeitos colaterais devido a grande responsividade de praticamente todas as células do organismo em resposta a essa citocina (Balkwill, 2009). O aumento de TNF gerado por CI pode estar associado novamente à polarização M1, visto que essa citocina tem um papel fundamental na resposta pró-

inflamatória desencadeada por esse tipo de macrófago (Canè *et al.*, 2019; Najafi, Hashemi Goradel, *et al.*, 2019).

A quimiocina de atração de monócitos 1 (MCP-1, também denominada CCL2) é produzida e secretada por diversas células, como fibroblastos, células epiteliais e principalmente monócitos/macrófagos, usualmente em resposta a citocinas pró-inflamatórias. Sua principal atividade é quimioatração de macrófagos, linfócitos e células NK através de um gradiente de concentração (Deshmane *et al.*, 2009).

Dentro do contexto tumoral a maior parte da produção de MCP-1 é feita pelas próprias células malignizadas, resultando em uma atividade pró-tumoral já demonstrada em alguns modelos *in vivo*, como os de carcinoma pulmonar de lewis e câncer de mama induzido pela linhagem 4T1 (Yoshimura, 2018). Porém, diferentes concentrações aparentam influenciar esse panorama. Nesbit e colaboradores (2001) transfectaram com diferentes quantidades de partículas virais (PFU/célula: unidades formadoras de placa/ célula) contendo a construção para expressão de MCP-1 uma linhagem advinda de melanoma humano primário (denominada SBcl2, sendo esta não tumorigênica em animais imunodeficientes, dependente de fatores de crescimento endógenos para proliferação e não produtora de MCP-1). Em seguida camundongos SCID (*severe combined immunodeficient mice*) foram inoculados para formação subcutânea de tumores com a linhagem SBcl2 transfectada, e o crescimento tumoral foi avaliado após 4, 8 e 14 dias. Células não transfectadas e aquelas transfectadas com 0.005 PFU/célula não originaram tumores. Animais inoculados com 0.5 PFU/célula desenvolveram tumores altamente vascularizados e contendo grande quantidade de infiltrado celular de monócitos na periferia tumoral. Curiosamente, células transfectadas com 50 PFU/célula, portanto expressando maiores quantidades de MCP-1, resultaram em tumores que tiveram rápida perda de viabilidade e progressão necrótica já ao 4º dia, apresentando grande infiltrado celular de monócitos na periferia e no microambiente tumoral, e não eram visíveis no 14º dia (Nesbit *et al.*, 2001). Desta forma, o aumento de MCP-1 detectado após o tratamento com CI na linhagem RAW 264.7 *in vitro* e no soro dos camundongos *in vivo* pode estar originando concentrações suficientes dessa quimiocina para inviabilizar e/ou reduzir a formação tumoral via o estado pró-inflamatório desencadeado, explicando parte dos efeitos *in vivo* reportados no presente trabalho.

O aumento de MCP-1 após o tratamento com CI também pode estar relacionado à ativação M1 dos macrófagos. Carson e colaboradores (2017)

avaliaram a expressão de marcadores de polarização frente ao estímulo com MCP-1 em macrófagos derivados da medula óssea de camundongos C57BL/6. O tratamento por 6h com concentrações de 100 e 250 µg/mL de MCP-1 resultaram em expressão prolongada de maiores níveis de TNF- α e Nos2 (associados à polarização M1) do que a concentração de 10 µg/mL. Após 2h de exposição a 100 µg/mL, a expressão de Arg1 (associada à polarização M2) foi significativamente diminuída. Além disso, o estímulo das células com moléculas sabidamente polarizadoras para M1 (IFN- γ e LPS) sozinhas ou em combinação com MCP-1 exógeno resultou em aumento da expressão de MCP-1 e de seu receptor Ccr2. A exposição a IL-4 (polarizadora para M2) apenas gerou aumento significativo da expressão de MCP-1 quando em combinação com quimiocina exógena (Carson *et al.*, 2017), mostrando que apesar de não induzir por conta própria uma distinta polarização M1, a quimiocina MCP-1 aumenta o direcionamento para esse tipo de ativação quando em presença de um estímulo pró-M1. Dado os resultados mostrando o aumento de marcadores comumente associados à ativação clássica de macrófagos após o tratamento com CI, uma possível explicação para o aumento de MCP-1 demonstrado pode ser um estímulo pró-M1 causado pelo polissacarídeo.

Células NK têm um papel fundamental no controle da progressão tumoral e da formação de metástases, promovendo direta eliminação de células malignizadas (López-Soto *et al.*, 2017). Durante a primeira hora após inoculação de células B16-F10 na veia caudal de camundongos C57BL/6, há um rápido aumento de células NK nos pulmões desses animais (Grundy, Zhang e Sentman, 2007) e a depleção destas células resulta em aumento de tumores primários induzidos pelo modelo de metástase experimental (Sathe *et al.*, 2014). Macrófagos e monócitos podem participar da ativação de células NK através de contato direto via interação com o receptor NKG2 (na célula NK) e através da produção de citocinas, como TNF- α e IL-18 – resultando em aumento da liberação de IFN- γ (Michel, Hentges e Zimmer, 2012; Zhou *et al.*, 2012). A quimiocina MCP-1 é um conhecido atrator de células NK (Allavena *et al.*, 1994; Morrison *et al.*, 2003; Zhang, C. *et al.*, 2019), também participando do estímulo de liberação de IFN- γ (Cui *et al.*, 2016; Tsuchiyama *et al.*, 2007). Dessa forma, o aumento da capacidade de *killing* de células NK contra a linhagem B16-F10 após o tratamento *in vivo* com CI pode explicar parte da atividade antitumoral observada, principalmente quanto a redução observada nos ensaios de metástase experimental, e essa modulação pode ser o resultado da comunicação

entre macrófagos/monócitos - ativados pelo polissacarídeo - e as células NK, bem como do aumento de MCP-1 no soro dos animais. É interessante ressaltar que o aumento da capacidade de *killing* das células NK é resultado da imunomodulação que ocorreu de forma sistêmica nos camundongos, visto que uma vez isolado do baço dos animais, as células NK obtidas e as células B16-F10 utilizadas não foram expostas ao polissacarídeo.

Os resultados aqui observados de imunomodulação podem estar relacionados a uma interação do polissacarídeo com Receptores do Tipo Toll (*Toll Like Receptors*, TLR). TLRs são uma família de receptores presentes principalmente em células dendríticas e macrófagos e são capazes de reconhecer padrões moleculares associados a patógenos e rapidamente iniciar a resposta imune inata, ao mesmo tempo que desencadeiam a liberação de citocinas pró-inflamatórias para orquestrar a resposta adaptativa. A interação com diferentes TLRs resulta em diferentes vias de sinalização através de proteínas adaptadoras, como Myd-88 e Interferon- β indutor de adaptador contendo domínio-TIR (TRIF) (Kawasaki e Kawai, 2014; Takeda e Akira, 2005). A literatura descreve polissacarídeos com atividades imunomoduladoras desencadeadas pela interação com TLR (Makarenkova *et al.*, 2012; Yin, Zhang e Li, 2019), assim como galactanas induzindo esse tipo de atividade através de ligação com TLR 2 e 4 (Myers, Deaver e Lewandowski, 2019; Yan *et al.*, 2019). Algumas peculiaridades estruturais parecem estar mais relacionadas a interação com TLRs, especificamente com TLR-4. O monossacarídeo galactana é o composto mais comum presente em polissacarídeos extraídos de plantas a interagir com TLR-4, e um dos mais relevantes em animais e algas; em homogalactanas, ligações glicosídicas do tipo α -(1,3), α -(1,4) e β -(1,4) estão relacionadas à interação com TLR-4; e polissacarídeos com peso molecular entre 10 e 100 kDa parecem ser os mais comuns a interagir com este receptor (Zhang *et al.*, 2016). Dessa forma, a atividade do polissacarídeo CI pode estar relacionada à sua estrutura que permite sua interação com TLRs.

Uma possível característica estrutural associada às atividades observadas no presente trabalho pode ser a presença de grupos sulfato no polissacarídeo CI. A presença de resíduos de sulfato e a maior sulfatação são associadas a maior grau de atividade de polissacarídeos obtidos de algas marinhas (Patel, 2012). Duas frações compostas de homogalactanas sulfatadas obtidas da alga verde *Udotea flabellum* apresentaram uma alta capacidade anticoagulante no ensaio de APTT,

não induzindo citotoxicidade nem diminuição de proliferação da linhagem B16-F10, mas diminuindo a adesão e a migração destas células sobre fibronectina; a dessulfatação inespecífica dessas moléculas eliminou as atividades observadas (Mendes Marques *et al.*, 2019). A sulfatação de uma beta-glucana comercial extraída de algas do gênero *Laminaria* mais do que dobrou sua atividade citotóxica contra a linhagem de câncer de cólon humano LoVo (Ji, Ji e Meng, 2013). A manipulação da inserção e remoção de grupos sulfato de polissacarídeos como CI e subsequente análise das atividades biológicas poderiam ser desenvolvidos para demonstrar a relação sulfatação/atividade e possivelmente indicar direções para compostos mais eficazes.

Com o intuito de explorar ainda mais a promissora atividade induzida por CI no modelo de metástase experimental, bem como a capacidade do composto em atuar em modelos de câncer humano, empregamos a linhagem MDA-MB-231 em camundongos imunodeficientes NSG. Esta linhagem advem de uma efusão pleural obtida de uma paciente com adenocarcinoma mamário metastático, sendo portanto altamente invasiva e utilizada para simular os estágios avançados do câncer de mama (Agus *et al.*, 2013; Cailleau, Olivé e Cruciger, 1978). O pré-tratamento de camundongos NSG por 24h com o polissacarídeo CI seguido da inoculação dessa linhagem e consecutivo tratamento diário com o composto resultou em diminuição significativa da formação de nódulos tumorais nos pulmões dos camundongos, efeito observado desde o 9º dia de desenvolvimento tumoral. A inexistência de um sistema imune eficiente nos camundongos NSG poderia indicar a ausência da dependência deste mecanismo para o efeito observado pelo polissacarídeo CI nos resultados previamente reportados. Todos os dados obtidos com CI diretamente nas linhagens B16-F10 e RAW 264.7, assim como o observado no sistema imune dos camundongos C57BL/6, nos levam a acreditar que este não é o caso. O polissacarídeo CI parece possuir diferentes mecanismos de ação, desde atividades diretas nas linhagens celulares malignizadas até a modulação do sistema imune. Além disso, apesar de possuir um sistema imune deficiente, camundongos NSG apresentam uma porção residual do sistema imune inato, principalmente de monócitos/macrófagos (Hu, Rooijen, Van e Yang, 2011; Shultz *et al.*, 2012). Portanto, o resultado observado pode ser através da modulação de dinâmicas malignizadas da linhagem MDA-MB-231, como observado para as células B16-F10 nos ensaios de invasão, marcação de WGA, adesão e formação de colônias, tendo

também uma porção associada a ativação dos monócitos/macrófagos ainda presentes no camundongo. Esse resultado promissor encontrado na linhagem de câncer de mama abre novas perspectivas para a continuação dos estudos com o composto CI.

A combinação do efeito de redução da progressão do tumor sólido, da diminuição da progressão do modelo metástase experimental e a ausência de efeitos colaterais detectáveis revelam que CI é um promissor composto antitumoral dentro das condições experimentais empregadas, sendo um potencial candidato a progredir em demais ensaios pré-clínicos.

A figura abaixo (Figura 27) agrupa os principais resultados demonstrados no presente trabalho.

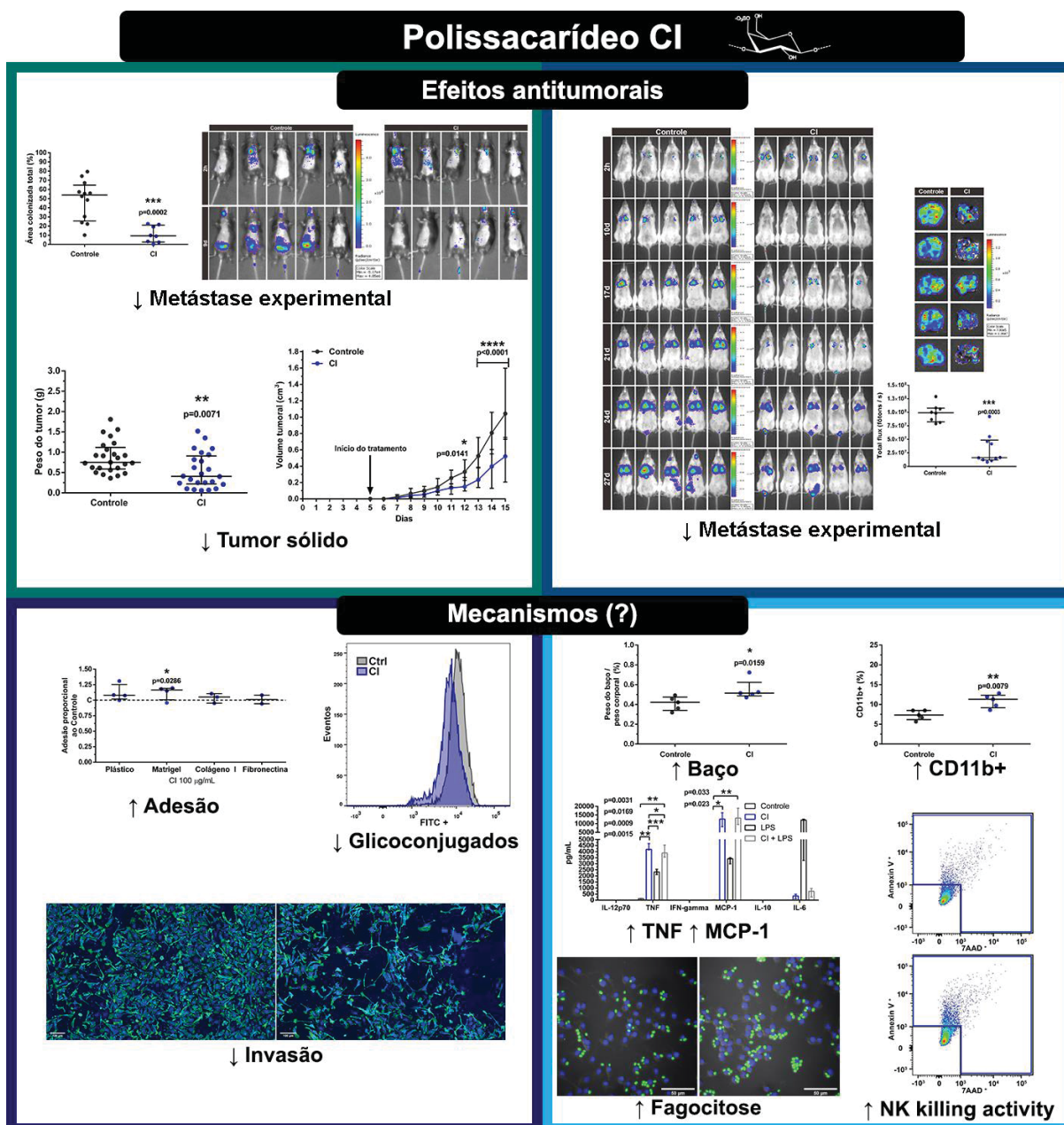


FIGURA 27 – RESUMO DAS PRINCIPAIS ATIVIDADES INDUZIDAS POR CI: Representação das principais atividades induzidas por CI nos modelos *in vivo* e *in vitro*, empregando as linhagens B16-F10, RAW 264.7 e MDA-MD-231 e camundongos C57BL/6 e NSG.

7. CONCLUSÕES

Os resultados aqui apresentados mostram a atividade antitumoral de uma homogalactana sulfatada extraída da alga *Codium isthmocladum*. É possível concluir que:

- O tratamento com CI após o estabelecimento do tumor sólido induzido pela linhagem B16-F10 diminui a progressão tumoral, sendo este o primeiro relato

de atividade antitumoral em modelo *in vivo* de melanoma induzido por uma homogalactana sulfatada obtida de alga verde;

- O pré-tratamento com CI 24 h antes da inoculação da linhagem B16-F10 resulta na diminuição da progressão do modelo de metástase experimental, efeito observado desde os primeiros dias do ensaio; o mesmo efeito também ocorre no modelo desenvolvido com a linhagem MDA-MB-231;
- O composto CI não aparenta induzir efeitos colaterais nos camundongos; este resultado corrobora com a prévia observação de que esse polissacarídeo não é citotóxico na linhagem B16-F10, e com a observação no presente trabalho de que o composto também não é citotóxico na linhagem de macrófagos RAW 264.7;
- A atividade antitumoral do CI pode estar relacionada às modulações *in vitro* observadas, diminuindo a invasão, a glicosilação e a adesão da linhagem B16-F10;
- O aumento da subpopulação de monócitos/macrófagos, da produção de citocinas pró-inflamatórias, da capacidade de *killing* de células NK e da atividade de macrófagos indicam que possivelmente parte da atividade antitumoral observada deve-se a imunomodulação induzida pelo tratamento com CI.

REFERÊNCIAS

- ABBASI, N. R.; SHAW, H. M.; RIGEL, D. S.; FRIEDMAN, R. J.; MCCARTHY, W. H.; OSMAN, I.; KOPF, A. W.; POLSKY, D. Early Diagnosis of Cutaneous Melanoma. **Jama**, v. 292, n. 22, p. 2771, 2004.
- ABDULJAUWAD, S. N.; AHMED, H. UR R. Enhancing cancer cell adhesion with clay nanoparticles for countering metastasis. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–12, 2019.
- ABEL, A. M.; YANG, C.; THAKAR, M. S.; MALARKANNAN, S. Natural killer cells: Development, maturation, and clinical utilization. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. AUG, p. 1–23, 2018.
- ABU, R.; JIANG, Z.; UENO, M.; ISAKA, S.; NAKAZONO, S.; OKIMURA, T.; CHO, K.; YAMAGUCHI, K.; KIM, D.; ODA, T. Anti-metastatic effects of the sulfated polysaccharide ascophyllan isolated from *Ascophyllum nodosum* on B16 melanoma. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 458, n. 4, p. 727–

732, 2015.

AGUS, D. B. *et al.* A physical sciences network characterization of non-tumorigenic and metastatic cells. **Scientific Reports**, v. 3, 2013.

ALE, M. T.; MARUYAMA, H.; TAMAUCHI, H.; MIKKELSEN, J. D.; MEYER, A. S. Fucose-containing sulfated polysaccharides from brown seaweeds inhibit proliferation of melanoma cells and induce apoptosis by activation of caspase-3 in vitro. **Marine Drugs**, v. 9, n. 12, p. 2605–2621, 2011.

ALLAVENA, P.; BIANCHI, G.; ZHOU, D.; DAMME, J. VAN; JÍLEK, P.; SOZZANI, S.; MANTOVANI, A. Induction of natural killer cell migration by monocyte chemotactic protein-1, -2 and -3. **European Journal of Immunology**, v. 24, n. 12, p. 3233–3236, 1994.

ALVES, C.; SILVA, J.; PINTEUS, S.; GASPAR, H.; ALPOIM, M. C.; BOTANA, L. M.; PEDROSA, R. From marine origin to therapeutics: The antitumor potential of marine algae-derived compounds. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, n. AUG, p. 1–24, 2018.

ANANTHAKRISHNAN, R.; EHRLICHER, A. The forces behind cell movement. **International Journal of Biological Sciences**, v. 3, n. 5, p. 303–317, 2007.

ANDERSON, L. R.; OWENS, T. W.; NAYLOR, M. J. Integrins in development and cancer. **Biophysical Reviews**, v. 6, n. 2, p. 191–202, 2014.

ANDRADE, L. F. DE *et al.* Antibody-mediated inhibition of MICA and MICB shedding promotes NK cell-driven tumor immunity. **Science**, v. 359, n. 6383, p. 1537–1542, 2018.

APALLA, Z.; NASHAN, D.; WELLER, R. B.; CASTELLSAGUÉ, X. Skin Cancer: Epidemiology, Disease Burden, Pathophysiology, Diagnosis, and Therapeutic Approaches. **Dermatology and Therapy**, v. 7, p. 5–19, 2017.

ASCIERTO, P. A.; KIRKWOOD, J. M.; GROB, J.-J.; SIMEONE, E.; GRIMALDI, A. M.; MAIO, M.; PALMIERI, G.; TESTORI, A.; MARINCOLA, F. M.; MOZZILLO, N. The role of BRAF V600 mutation in melanoma. **Journal of Translational Medicine**, v. 10, n. 1, p. 85, 3 dez. 2012.

BAJPAI, V. K.; RATHER, I. A.; LIM, J.; PARK, Y. Diversity of bioactive polysaccharide originated from marine sources : A review. v. 43, n. October, p. 1857–1869, 2014.

BALKWILL, F. Tumour necrosis factor and cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 9, n. 5, p. 361–371, 3 maio 2009.

BALKWILL, F. R.; CAPASSO, M.; HAGEMANN, T. The tumor microenvironment at a

glance. **Journal of Cell Science**, v. 125, n. 23, p. 5591–5596, 2012.

BASHIR, K. M. I.; CHOI, J. S. Clinical and physiological perspectives of β -glucans: The past, present, and future. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 9, 2017.

BELLAN, D. D. L. **Avaliação Dos Efeitos Biológicos Induzidos Por Polissacarídeos Extraídos De Algas Em Linhagem B16-F10 (Melanoma Murino)**. [s.l.] Universidade Federal do Paraná, 2016.

BELLAN, D. DE L. **AVALIAÇÃO DOS EFEITOS BIOLÓGICOS INDUZIDOS POR POLISSACARÍDEOS EXTRAÍDOS DE ALGAS EM LINHAGEM B16-F10 (MELANOMA MURINO)**. [s.l.] Universidade Federal do Paraná, 2016.

BELLAN, D. DE L.; MAZEPA, E.; BISCAIA, S. M. P.; GONÇALVES, J. P.; OLIVEIRA, C. C.; ROSSI, G. R.; FERREIRA, L. G.; NOSEDA, M. D.; TRINDADE, E. S.; DUARTE, M. E. R.; FRANCO, C. R. C. Non-Cytotoxic Sulfated Heterorhamnan from *Gayralia brasiliensis* Green Seaweed Reduces Driver Features of Melanoma Metastatic Progression. **Marine Biotechnology**, p. 10126, 2020.

BELLAN, D. DE L.; MAZEPA, E.; BISCAIA, S. M. P.; GONÇALVES, J. P.; OLIVEIRA, C. C.; ROSSI, G. R.; FERREIRA, L. G.; NOSEDA, M. D.; TRINDADE, E. S.; DUARTE, M. E. R.; FRANCO, C. R. C. Non-Cytotoxic Sulfated Heterorhamnan from *Gayralia brasiliensis* Green Seaweed Reduces Driver Features of Melanoma Metastatic Progression. **Marine Biotechnology**, v. 22, n. 2, p. 194–206, 2020.

BENSON, D. M. *et al.* IPH2101, a novel anti-inhibitory KIR antibody, and lenalidomide combine to enhance the natural killer cell versus multiple myeloma effect. **Blood**, v. 118, n. 24, p. 6387–6391, 2011.

BHAVANANDAN, V. P.; KATLIC, A. W. The Interaction of Wheat Germ Agglutinin with Sialoglycoproteins. v. 254, n. 10, p. 4000–4008, 1979.

BISCAIA, S. M. P. *et al.* Safe therapeutics of murine melanoma model using a novel antineoplastic, the partially methylated mannogalactan from *Pleurotus eryngii*.

Carbohydrate Polymers, v. 178, n. August, p. 95–104, 2017.

BORENFREUND, E.; PUERNER, J. A. A simple quantitative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity assays (HTD/NR-90). **Journal of Tissue Culture Methods**, v. 9, n. 75101, p. 7–9, 1985.

BRAEUER, R. R.; WATSON, I. R.; WU, C. J.; MOBLEY, A. K.; KAMIYA, T.; SHOSHAN, E.; BAR-ELI, M. Why is melanoma so metastatic? **Pigment Cell and Melanoma Research**, v. 27, n. 1, p. 19–36, 2014.

- BRAY, F.; FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I.; SIEGEL, R. L.; TORRE, L. A.; JEMAL, A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 68, n. 6, p. 394–424, 2018.
- BREMNES, R. M.; BUSUND, L. T.; KILVER, T. L.; ANDERSEN, S.; RICHARDSEN, E.; PAULSEN, E. E.; HALD, S.; KHANEHKENARI, M. R.; COOPER, W. A.; KAO, S. C.; DONNEM, T. The role of tumor-infiltrating lymphocytes in development, progression, and prognosis of non-small cell lung cancer. **Journal of Thoracic Oncology**, v. 11, n. 6, p. 789–800, 2016.
- BUCHBINDER, E. I.; DESAI, A. CTLA-4 and PD-1 pathways similarities, differences, and implications of their inhibition. **American Journal of Clinical Oncology: Cancer Clinical Trials**, v. 39, n. 1, p. 98–106, 2016.
- BÜLL, C.; BOLTJE, T. J.; DINTHER, E. A. W. VAN; PETERS, T.; GRAAF, A. M. A. DE; LEUSEN, J. H. W.; KREUTZ, M.; FIGDOR, C. G.; BROK, M. H. DEN; ADEMA, G. J. Targeted delivery of a sialic acid-blocking glycomimetic to cancer cells inhibits metastatic spread. **ACS Nano**, v. 9, n. 1, p. 733–745, 2015.
- BURKHOLDER, B.; HUANG, R. Y.; BURGESS, R.; LUO, S.; JONES, V. S.; ZHANG, W.; LV, Z. Q.; GAO, C. Y.; WANG, B. L.; ZHANG, Y. M.; HUANG, R. P. Tumor-induced perturbations of cytokines and immune cell networks. **Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer**, v. 1845, n. 2, p. 182–201, 2014.
- BURSTEIN, H. J. *et al.* Clinical Cancer Advances 2017: Annual Report on Progress Against Cancer From the American Society of Clinical Oncology. **Journal of Clinical Oncology**, v. 35, n. 12, p. 1341–1367, 2017.
- BUSCHMANN, A. H.; CAMUS, C.; INFANTE, J.; NEORI, A.; ISRAEL, Á.; HERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, M. C.; PEREDA, S. V.; GOMEZ-PINCHETTI, J. L.; GOLBERG, A.; TADMOR-SHALEV, N.; CRITCHLEY, A. T. Seaweed production: overview of the global state of exploitation, farming and emerging research activity. **European Journal of Phycology**, v. 52, n. 4, p. 391–406, 2017.
- CAILLEAU, R.; OLIVÉ, M.; CRUCIGER, Q. V. J. Long-term human breast carcinoma cell lines of metastatic origin: Preliminary characterization. **In Vitro**, v. 14, n. 11, p. 911–915, 1978.
- CANÈ, S.; UGEL, S.; TROVATO, R.; MARIGO, I.; SANCTIS, F. DE; SARTORIS, S.; BRONTE, V. The Endless Saga of Monocyte Diversity. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. August, p. 1–18, 2019.

- CARSON, W. F.; SALTER-GREEN, S. E.; SCOLA, M. M.; JOSHI, A.; GALLAGHER, K. A.; KUNKEL, S. L. Enhancement of macrophage inflammatory responses by CCL2 is correlated with increased miR-9 expression and downregulation of the ERK1/2 phosphatase Dusp6. **Cellular Immunology**, v. 314, n. 734, p. 63–72, 2017.
- CASTLE, J. C. *et al.* Exploiting the mutanome for tumor vaccination. **Cancer Research**, v. 72, n. 5, p. 1081–1091, 2012.
- CHABNER, B. A.; ROBERTS, T. G. Chemotherapy and the war on cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 5, n. 1, p. 65–72, 2005.
- CHAMBERS, A. F.; GROOM, A. C.; MACDONALD, I. C. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. **Nature reviews. Cancer**, v. 2, n. 8, p. 563–72, ago. 2002.
- CHEN, L.; WEI, Y.; ZHAO, S.; ZHANG, M.; YAN, X.; GAO, X.; LI, J.; GAO, YUTONG; ZHANG, A.; GAO, YING. Antitumor and immunomodulatory activities of total flavonoids extract from persimmon leaves in H22 liver tumor-bearing mice. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–11, 2018.
- CHEN, X.; DU, Y.; LIN, X. Q.; QIAN, Y.; ZHOU, T.; HUANG, Z. M. CD4 + CD25 + regulatory T cells in tumor immunity. **International Immunopharmacology**, v. 34, p. 244–249, 2016.
- CHENG, H.; WANG, Z.; FU, L.; XU, T. Macrophage polarization in the development and progression of ovarian cancers: An overview. **Frontiers in Oncology**, v. 9, n. MAY, p. 1–11, 2019.
- CHHABRA, G.; NDIAYE, M. A.; GARCIA-PETERSON, L. M.; AHMAD, N. Melanoma Chemoprevention: Current Status and Future Prospects. **Photochemistry and Photobiology**, v. 93, n. 4, p. 975–989, jul. 2017.
- CHOUCAIR, K.; DUFF, J. R.; CASSIDY, C. S.; ALBRETHSEN, M. T.; KELSO, J. D.; LENHARD, A.; STAATS, H.; PATEL, R.; BRUNICARDI, F. C.; DWORKIN, L.; NEMUNAITIS, J. Natural killer cells: a Review of biology, therapeutic potential and challenges in treatment of solid tumors. **Future Oncology**, 2019.
- CHU, W.-M. Tumor necrosis factor. **Cancer Letters**, v. 328, n. 2, p. 222–225, 18 jan. 2013.
- CICHOREK, M.; WACHULSKA, M.; STASIEWICZ, A.; TYMINSKA, A. Skin melanocytes: Biology and development. **Postepy Dermatologii i Alergologii**, v. 30, n. 1, p. 30–41, 2013.
- CLARKE, G.; JOHNSTON, S.; CORRIE, P.; KUHN, I.; BARCLAY, S. Withdrawal of

anticancer therapy in advanced disease: A systematic literature review. **BMC Cancer**, v. 15, n. 1, p. 1–9, 2015.

COHEN, J. V. *et al.* Melanoma central nervous system metastases: current approaches, challenges, and opportunities. **Pigment Cell and Melanoma Research**, v. 29, n. 6, p. 627–642, 2016.

COSTA, L. M. M. DA; CROVADOR, C. D. S.; CARVALHO, C. E. B. DE; VAZQUEZ, V. D. L. Characteristics of Brazilian melanomas: real-world results before and after the introduction of new therapies. **BMC Research Notes**, v. 12, n. 1, p. 296, 28 dez. 2019.

COSTA, L. S. *et al.* Biological activities of sulfated polysaccharides from tropical seaweeds. **Biomedicine & pharmacotherapy = Biomédecine & pharmacothérapie**, v. 64, n. 1, p. 21–8, jan. 2010.

COX, T. R.; CHITTY, J. L.; FILIPE, E. C.; LUCAS, M. C.; HERRMANN, D.; TIMPSON, P. Recent advances in understanding the complexities of metastasis. **F1000Research**, v. 7, p. 1–18, 2018.

CUI, R.; REKASI, H.; HEPNER-SCHEFCZYK, M.; FESSMANN, K.; PETRI, R. M.; BRUDEREK, K.; BRANDAU, S.; JÄGER, M.; FLOHÉ, S. B. Human mesenchymal stromal/stem cells acquire immunostimulatory capacity upon cross-talk with natural killer cells and might improve the NK cell function of immunocompromised patients. **Stem Cell Research and Therapy**, v. 7, n. 1, p. 1–13, 2016.

DESHMANE, S. L.; KREMLEV, S.; AMINI, S.; SAWAYA, B. E. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): An overview. **Journal of Interferon and Cytokine Research**, v. 29, n. 6, p. 313–325, 2009.

DOBOSZ, P.; DZIECIAŁKOWSKI, T. The Intriguing History of Cancer Immunotherapy. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. December, 2019.

DOMINGUES, B.; LOPES, J.; SOARES, P.; POPULO, H. Melanoma treatment in review. **ImmunoTargets and Therapy**, v. Volume 7, p. 35–49, 2018.

DUNN, G. P.; BRUCE, A. T.; IKEDA, H.; OLD, L. J.; SCHREIBER, R. D. Cancer immunoediting : from immuno- surveillance to tumor escape. v. 3, n. 11, p. 991–998, 2002.

DUNN, G. P.; OLD, L. J.; SCHREIBER, R. D. The Three Es of Cancer Immunoediting. **Annual Review of Immunology**, v. 22, n. 1, p. 329–360, 2004.

EGGERMONT, A. M. M.; KIRKWOOD, J. M. Re-evaluating the role of dacarbazine in metastatic melanoma: What have we learned in 30 years? **European Journal of**

Cancer, v. 40, n. 12, p. 1825–1836, 2004.

ENO, J. Immunotherapy Through the Years. **Journal of the Advanced Practitioner in Oncology**, v. 8, n. 7, p. 747–753, 1 dez. 2017.

FAGUET, G. B. A brief history of cancer: Age-old milestones underlying our current knowledge database. **International Journal of Cancer**, v. 136, n. 9, p. 2022–2036, 2015.

FAIÃO-FLORES, F.; SUAREZ, J. A. Q.; FRUET, A. C.; MARIA-ENGLER, S. S.; PARDI, P. C.; MARIA, D. A. Curcumin analog DM-1 in monotherapy or combinatory treatment with dacarbazine as a strategy to inhibit in vivo melanoma progression. **PLoS ONE**, v. 10, n. 3, p. 1–16, 2015.

FALZONE, L.; SALOMONE, S.; LIBRA, M. Evolution of cancer pharmacological treatments at the turn of the third millennium. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, n. NOV, 2018.

FAN, Y.; WANG, W.; SONG, W.; CHEN, H.; TENG, A.; LIU, A. Partial characterization and anti-tumor activity of an acidic polysaccharide from *Gracilaria lemaneiformis*. **Carbohydrate Polymers**, v. 88, n. 4, p. 1313–1318, 2012.

FARAHANI, E.; PATRA, H. K.; JANGAMREDDY, J. R.; RASHEDI, I.; KAWALEC, M.; RAO PARITI, R. K.; BATAKIS, P.; WIECHEC, E. Cell adhesion molecules and their relation to (cancer) cell stemness. **Carcinogenesis**, v. 35, n. 4, p. 747–759, 2014.

FARHOOD, B.; NAJAFI, M.; MORTEZAEI, K. CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes in cancer immunotherapy: A review. **Journal of Cellular Physiology**, v. 234, n. 6, p. 8509–8521, 2019.

FARIAS, E. H. C.; POMIN, V. H.; VALENTE, A.-P.; NADER, H. B.; ROCHA, H. A O.; MOURÃO, P. A S. A preponderantly 4-sulfated, 3-linked galactan from the green alga *Codium isthmocladum*. **Glycobiology**, v. 18, n. 3, p. 250–9, mar. 2008.

FEARON, K. *et al.* Definition and classification of cancer cachexia: An international consensus. **The Lancet Oncology**, v. 12, n. 5, p. 489–495, 2011.

FERREIRA, S. S.; PASSOS, C. P.; MADUREIRA, P.; VILANOVA, M.; COIMBRA, M. A. Structure-function relationships of immunostimulatory polysaccharides: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 132, p. 378–396, 2015.

FIDLER, M. M.; SOERJOMATARAM, I.; BRAY, F. A global view on cancer incidence and national levels of the human development index. **International Journal of Cancer**, v. 139, n. 11, p. 2436–2446, 2016.

FITTON, J. H.; STRINGER, D. N.; PARK, A. Y.; KARPINIEC, S. S. Therapies from

- fucoidan: New developments. **Marine Drugs**, v. 17, n. 10, 2019.
- FITZMAURICE, C. *et al.* Global, regional, and national cancer incidence, mortality, years of life lost, years lived with disability, and disability-adjusted life-years for 32 cancer groups, 1990 to 2015: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study Global Burden . **JAMA Oncology**, v. 3, n. 4, p. 524–548, 2017.
- FOTAKIS, G.; TIMBRELL, J. A. In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. **Toxicology Letters**, v. 160, n. 2, p. 171–177, 2006.
- FRANKEN, N. A P.; RODERMOND, H. M.; STAP, J.; HAVEMAN, J.; BREE, C. VAN. Clonogenic assay of cells in vitro. **Nature protocols**, v. 1, n. 5, p. 2315–9, jan. 2006.
- FRIEDMAN, R. J.; RIGEL, D. S.; KOPF, A. W. Early Detection of Malignant Melanoma: The Role of Physician Examination and Self-Examination of the Skin. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 35, n. 3, p. 130–151, 1 maio 1985.
- FUJIMURA, T.; KAMBAYASHI, Y.; FUJISAWA, Y.; HIDAKA, T.; AIBA, S. Tumor-associated macrophages: Therapeutic targets for skin cancer. **Frontiers in Oncology**, v. 8, n. JAN, p. 1–6, 2018.
- GERBER, D. E. Targeted therapies: A new generation of cancer treatments. **American Family Physician**, v. 77, n. 3, p. 311–319, 2008.
- GILLIES, R. G.; DIDIER, N.; DENTON, M. Determination of cell number in monolayer cultures. **Analytical Biochemistry**, v. 159, p. 109–113, 1986.
- GLOUSHANKOVA, N. A.; RUBTSOVA, S. N.; ZHITNYAK, I. Y. Cadherin-mediated cell-cell interactions in normal and cancer cells. **Tissue Barriers**, v. 5, n. 3, p. 1–15, 2017.
- GLOUSHANKOVA, N. A.; ZHITNYAK, I. Y.; RUBTSOVA, S. N. Role of Epithelial Mesenchymal Transition in Tumor Progression. v. 83, n. 12, 2018.
- GÓMEZ-CUADRADO, L.; TRACEY, N.; MA, R.; QIAN, B.; BRUNTON, V. G. Mouse models of metastasis: progress and prospects. **Disease Models & Mechanisms**, v. 10, n. 9, p. 1061–1074, 2017.
- GONZALEZ-AVILA, G.; SOMMER, B.; MENDOZA-POSADA, D. A.; RAMOS, C.; GARCIA-HERNANDEZ, A. A.; FALFAN-VALENCIA, R. Matrix metalloproteinases participation in the metastatic process and their diagnostic and therapeutic applications in cancer. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 137, n. October 2018, p. 57–83, 2019.
- GORDON, S.; PLÜDDEMANN, A. Tissue macrophages: Heterogeneity and

- functions. **BMC Biology**, v. 15, n. 1, p. 1–18, 2017.
- GORRY, C.; MCCULLAGH, L.; BARRY, M. Economic Evaluation of Systemic Treatments for Advanced Melanoma: A Systematic Review. **Value in Health**, v. 23, n. 1, p. 52–60, 2020.
- GRUNDY, M. A.; ZHANG, T.; SENTMAN, C. L. NK cells rapidly remove B16F10 tumor cells in a perforin and interferon-gamma independent manner in vivo. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 56, n. 8, p. 1153–1161, 2007.
- HAMED, I.; ÖZOGUL, F.; ÖZOGUL, Y.; REGENSTEIN, J. M. Marine Bioactive Compounds and Their Health Benefits: A Review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 14, n. 4, p. 446–465, 2015.
- HAMIDI, H.; IVASKA, J. Every step of the way: integrins in cancer progression and metastasis. **Nature Reviews Cancer**, v. 18, n. 9, p. 1–16, 2018.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The Hallmarks of Cancer. **Cell**, v. 100, p. 57–70, 2000.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–74, 4 mar. 2011.
- HARTMAN, R. I.; LIN, J. Y. Cutaneous Melanoma—A Review in Detection, Staging, and Management. **Hematology/Oncology Clinics of North America**, v. 33, n. 1, p. 25–38, 2019.
- HELBERT, W. Marine polysaccharide sulfatases. **Frontiers in Marine Science**, v. 4, n. JAN, p. 1–10, 2017.
- HEO, J. R.; KIM, N. H.; CHO, J.; CHOI, K. C. Current treatments for advanced melanoma and introduction of a promising novel gene therapy for melanoma (Review). **Oncology Reports**, v. 36, n. 4, p. 1779–1786, 2016.
- HIRAYAMA, D.; IIDA, T.; NAKASE, H. The phagocytic function of macrophage-enforcing innate immunity and tissue homeostasis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 1, 2018.
- HIROHASHI, S. Inactivation of the E-cadherin-mediated cell adhesion system in human cancers. **American Journal of Pathology**, v. 153, n. 2, p. 333–339, 1998.
- HU, W.; WANG, G.; HUANG, D.; SUI, M.; XU, Y. Cancer immunotherapy based on natural killer cells: Current progress and new opportunities. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. MAY, p. 1–16, 2019.
- HU, Z.; ROOIJEN, N. VAN; YANG, Y. G. Macrophages prevent human red blood cell reconstitution in immunodeficient mice. **Blood**, v. 118, n. 22, p. 5938–5946, 2011.

- HWANG, E. K.; BAEK, J. M.; PARK, C. S. Cultivation of the green alga, *Codium fragile* (Suringar) Hariot, by artificial seed production in Korea. **Journal of Applied Phycology**, v. 20, n. 5, p. 469–475, 2008.
- IKEHATA, H.; ONO, T. The Mechanisms of UV Mutagenesis. **Journal of Radiation Research**, v. 52, n. 2, p. 115–125, 2011.
- ITO, K.; NAKAZATO, H.; KOIKE, A.; TAKAGI, H.; SAJI, S.; BABA, S.; MAI, M.; SAKAMOTO, J. I.; OHASHI, Y. Long-term effect of 5-fluorouracil enhanced by intermittent administration of polysaccharide K after curative resection of colon cancer. A randomized controlled trial for 7-year follow-up. **International Journal of Colorectal Disease**, v. 19, n. 2, p. 157–164, 2004.
- JANISZEWSKA, M.; PRIMI, M. C.; IZARD, T. Cell adhesion in cancer: Beyond the migration of single cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 295, n. 8, p. 2495–2505, 2020.
- JANSSEN, L. M. E.; RAMSAY, E. E.; LOGSDON, C. D.; OVERWIJK, W. W. The immune system in cancer metastasis : friend or foe ? p. 1–14, 2017.
- JAROSZ-BIEJ, M.; KAMIŃSKA, N.; MATUSZCZAK, S.; CICHÓN, T.; PAMUŁA-PIŁAT, J.; CZAPLA, J.; SMOLARCZYK, R.; SKWARZYŃSKA, D.; KULIK, K.; SZALA, S. M1-like macrophages change tumor blood vessels and microenvironment in murine melanoma. **PLoS ONE**, v. 13, n. 1, p. 1–26, 2018.
- JI, C. F.; JI, Y. BIN; MENG, D. Y. Sulfated modification and anti-tumor activity of laminarin. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 6, n. 5, p. 1259–1264, 2013.
- JIANG, Z.; ABU, R.; ISAKA, S.; NAKAZONO, S.; UENO, M.; OKIMURA, T.; YAMAGUCHI, K.; ODA, T. Inhibitory effect of orally-administered sulfated polysaccharide ascophyllan isolated from *Ascophyllum nodosum* on the growth of sarcoma-180 solid tumor in mice. **Anticancer Research**, v. 34, n. 4, p. 1663–1672, 2014.
- JIAO, G.; YU, G.; ZHANG, J.; EWART, H. S. Chemical structures and bioactivities of sulfated polysaccharides from marine algae. **Marine Drugs**, v. 9, n. 2, p. 196–233, 2011.
- JIAO, L.; JIANG, P.; ZHANG, L.; WU, M. Antitumor and Immunomodulating Activity of Polysaccharides from *Enteromorpha intestinalis*. v. 428, p. 421–428, 2010.
- JIN, J.-O.; SONG, M.-G.; KIM, Y.-N.; PARK, J.-I.; KWAK, J.-Y. The mechanism of fucoidan-induced apoptosis in leukemic cells: involvement of ERK1/2, JNK, glutathione, and nitric oxide. **Molecular carcinogenesis**, v. 49, n. 8, p. 771–82, ago.

2010.

JIN, L. Q.; ZHENG, Z. J.; PENG, Y.; LI, W. X.; CHEN, X. M.; LU, J. X. Opposite effects on tumor growth depending on dose of *Achyranthes bidentata* polysaccharides in C57BL/6 mice. **International Immunopharmacology**, v. 7, n. 5, p. 568–577, 2007.

KALIKS, R. A.; SANTOS, A. M.; MATOS, T. F.; HOLTZ, L. How is advanced melanoma treated in the Public Health System in Brazil : a call for change . Como o melanoma avançado é tratado no Sistema Público de Saúde no Brasil : um pedido de mudança . p. 1–7, 2019.

KALLURI, R.; WEINBERG, R. A. The basics of epithelial-mesenchymal transition. **Journal of Clinical Investigation**, v. 119, n. 6, p. 1420–1428, 1 jun. 2009.

KANEDA, M. M. *et al.* PI3K γ 3 is a molecular switch that controls immune suppression. **Nature**, v. 539, n. 7629, p. 437–442, 2016.

KAWASAKI, T.; KAWAI, T. Toll-like receptor signaling pathways. **Frontiers in Immunology**, v. 5, n. SEP, p. 1–8, 2014.

KESSENBROCK, K.; PLAKS, V.; WERB, Z. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. **Cell**, v. 141, n. 1, p. 52–67, 2 abr. 2010.

KHALILI, A. A.; AHMAD, M. R. A Review of cell adhesion studies for biomedical and biological applications. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 8, p. 18149–18184, 2015.

KHAN, T.; DATE, A.; CHAWDA, H.; PATEL, K. Polysaccharides as potential anticancer agents—A review of their progress. **Carbohydrate Polymers**, v. 210, n. January, p. 412–428, 2019.

KIM, C.; LEE, C. W.; KOVACIC, L.; SHAH, A.; KLASA, R.; SAVAGE, K. J. Long-Term Survival in Patients with Metastatic Melanoma Treated with DTIC or Temozolomide. **The Oncologist**, v. 15, n. 7, p. 765–771, 2010.

KIM, H. J.; CANTOR, H. CD4 T-cell subsets and tumor immunity: the helpful and the not-so-helpful. **Cancer immunology research**, v. 2, n. 2, p. 91–98, 2014.

KIM, J. Y.; YOON, M. Y.; CHA, M. R.; HWANG, J. H.; PARK, E.; CHOI, S. U.; PARK, H. R.; HWANG, Y. IL. Methanolic extracts of *plocamium telfairiae* induce cytotoxicity and caspase-dependent apoptosis in HT-29 human colon carcinoma cells. **Journal of Medicinal Food**, v. 10, n. 4, p. 587–593, 2007.

KIURU, M.; BUSAM, K. J. The NF1 gene in tumor syndromes and melanoma. **Laboratory Investigation**, v. 97, n. 2, p. 146–157, 9 fev. 2017.

- KLICHINSKY, M. *et al.* Human chimeric antigen receptor macrophages for cancer immunotherapy. **Nature Biotechnology**, 2020.
- KOLSI, R. B. A.; JARDAK, N.; HAJKACEM, F.; CHAABEN, R.; JRIBI, I.; FEKI, A. EL; REBAI, T.; JAMOUCSI, K.; FKI, L.; BELGHITH, H.; BELGHITH, K. Anti-obesity effect and protection of liver-kidney functions by Codium fragile sulphated polysaccharide on high fat diet induced obese rats. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 102, p. 119–129, 2017.
- KRAMER, N.; WALZL, A.; UNGER, C.; ROSNER, M.; KRUPITZA, G.; HENGSTSCHLÄGER, M.; DOLZNIG, H. In vitro cell migration and invasion assays. **Mutation Research - Reviews in Mutation Research**, v. 752, n. 1, p. 10–24, 2013.
- KROSCINSKY, F.; STÖLZEL, F.; BONIN, S. VON; BEUTEL, G.; KOCHANNEK, M.; KIEHL, M.; SCHELLONGOWSKI, P. New drugs, new toxicities: Severe side effects of modern targeted and immunotherapy of cancer and their management. **Critical Care**, v. 21, n. 1, p. 1–11, 2017.
- KUMAR, B. V; CONNORS, T. J.; FARBER, D. L. Human T Cell Development, Localization, and Function throughout Life. **Immunity**, v. 48, n. 2, p. 202–213, fev. 2018.
- KUNZ, M. Oncogenes in melanoma: An update. **European Journal of Cell Biology**, v. 93, n. 1–2, p. 1–10, 2014.
- LABELLE, M.; HYNES, R. O. The Initial Hours of Metastasis: The Importance of Cooperative Host-Tumor Cell Interactions during Hematogenous Dissemination. **Cancer Discovery**, v. 2, n. 12, p. 1091–1099, 1 dez. 2012.
- LAMBERT, A. W.; PATTABIRAMAN, D. R.; WEINBERG, R. A. Emerging Biological Principles of Metastasis. **Cell**, v. 168, n. 4, p. 670–691, 2016.
- LANGSTEN, K. L.; KIM, J. H.; SARVER, A. L.; DEWHIRST, M.; MODIANO, J. F. Comparative Approach to the Temporo-Spatial Organization of the Tumor Microenvironment. **Frontiers in Oncology**, v. 9, n. November, p. 1–18, 2019.
- LARKIN, J. *et al.* Five-year survival with combined nivolumab and ipilimumab in advanced melanoma. **New England Journal of Medicine**, v. 381, n. 16, p. 1535–1546, 2019.
- LÄUBLI, H.; BORSIG, L. Altered Cell Adhesion and Glycosylation Promote Cancer Immune Suppression and Metastasis. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. September, p. 1–9, 2019.
- LEE, J.; OHTA, Y.; HAYASHI, K.; HAYASHI, T. Immunostimulating effects of a

sulfated galactan from *Codium fragile*. **Carbohydrate Research**, v. 345, n. 10, p. 1452–1454, 2010.

LI, F.; DING, J. Sialylation is involved in cell fate decision during development, reprogramming and cancer progression. **Protein and Cell**, v. 10, n. 8, p. 550–565, 2019.

LI, N.; MAO, W.; YAN, M.; LIU, X.; XIA, Z.; WANG, S.; XIAO, B.; CHEN, C.; ZHANG, L.; CAO, S. Structural characterization and anticoagulant activity of a sulfated polysaccharide from the green alga *Codium divaricatum*. v. 121, p. 175–182, 2015.

LI, W. J.; CHEN, Y.; NIE, S. P.; XIE, M. Y.; HE, M.; ZHANG, S. S.; ZHU, K. X. Ganoderma atrum polysaccharide induces anti-tumor activity via the mitochondrial apoptotic pathway related to activation of host immune response. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 112, n. 3, p. 860–871, 2011.

LIN, S.; AN, X.; GUO, Y.; GU, J.; XIE, T.; WU, Q.; SUI, X. Meta-analysis of astragalus-containing traditional chinese medicine combined with chemotherapy for colorectal cancer: Efficacy and safety to tumor response. **Frontiers in Oncology**, v. 9, n. AUG, p. 1–11, 2019.

LIOU, G. Y.; STORZ, P. **Reactive oxygen species in cancer**. [s.l.: s.n.]. v. 44
LIU, C. P.; ZHANG, X.; TAN, Q. L.; XU, W. X.; ZHOU, C. Y.; LUO, M.; LI, X.; HUANG, R. Y.; ZENG, X. NF- κ B pathways are involved in M1 polarization of RAW 264.7 macrophage by polyporus polysaccharide in the tumor microenvironment. **PLoS ONE**, v. 12, n. 11, p. 1–16, 2017.

LIU, Z.; GAO, T.; YANG, Y.; MENG, F.; ZHAN, F.; JIANG, Q.; SUN, X. Anti-Cancer Activity of Porphyrin and Carrageenan from Red Seaweeds. **Molecules**, v. 24, n. 23, p. 4286, 25 nov. 2019.

LÓPEZ-SOTO, A.; GONZALEZ, S.; SMYTH, M. J.; GALLUZZI, L. Control of Metastasis by NK Cells. **Cancer Cell**, v. 32, n. 2, p. 135–154, 2017.

LORENTZEN, H. F. Targeted therapy for malignant melanoma. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 46, p. 116–121, 2019.

LUGOWSKA, I.; TETERYCZ, P.; RUTKOWSKI, P. Immunotherapy of melanoma. **Współczesna Onkologia**, v. 2018, n. 1, p. 61–67, 2018.

LUO, M.; SHAO, B.; NIE, W.; WEI, X.-W.; LI, Y.-L.; WANG, B.-L.; HE, Z.-Y.; LIANG, X.; YE, T.-H.; WEI, Y.-Q. Antitumor and Adjuvant Activity of λ -carrageenan by Stimulating Immune Response in Cancer Immunotherapy. **Scientific reports**, v. 5, n. October 2014, p. 11062, 2015.

MAEDA, R.; IDA, T.; IHARA, H.; SAKAMOTO, T. Immunostimulatory Activity of Polysaccharides Isolated from *Caulerpa lentillifera* on Macrophage Cells.

Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, v. 76, n. 3, p. 501–505, 23 mar. 2012.

MAIMELA, N. R.; LIU, S.; ZHANG, Y. Fates of CD8⁺ T cells in Tumor

Microenvironment. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 17, p. 1–13, 2019.

MAIO, M. *et al.* Five-year survival rates for treatment-naïve patients with advanced melanoma who received ipilimumab plus dacarbazine in a phase III trial. **Journal of Clinical Oncology**, v. 33, n. 10, p. 1191–1196, 2015.

MAKARENKOVA, I. D.; LOGUNOV, D. Y.; TUKHVATULIN, A. I.; SEMENOVA, I. B.; ZVYAGINTSEVA, T. N.; GORBACH, V. I.; ERMAKOVA, S. P.; BESEDNOVA, N. N. Sulfated polysaccharides of brown seaweeds are ligands of toll-like receptors.

Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry, v. 6, n. 1, p. 75–80, 2012.

MALVI, P.; CHAUBE, B.; SINGH, S. V.; MOHAMMAD, N.; PANDEY, V.;

VIJAYAKUMAR, M. V.; RADHAKRISHNAN, R. M.; VANUOPADATH, M.; NAIR, S. S.; NAIR, B. G.; BHAT, M. K. Weight control interventions improve therapeutic efficacy of dacarbazine in melanoma by reversing obesity-induced drug resistance.

Cancer & Metabolism, v. 4, n. 1, 2016.

MANLUSOC, J. K. T.; HSIEH, C. L.; HSIEH, C. Y.; SALAC, E. S. N.; LEE, Y. T.;

TSAL, P. W. Pharmacologic application potentials of sulfated polysaccharide from marine algae. **Polymers**, v. 11, n. 7, 2019.

MARANDUCA, M. A.; BRANISTEANU, D.; SERBAN, D. N.; BRANISTEANU, D. C.; STOLERIU, G.; MANOLACHE, N.; SERBAN, I. L. Synthesis and physiological implications of melanic pigments (review). **Oncology Letters**, v. 17, n. 5, p. 4183–4187, 2019.

MARTINEZ, F. O.; GORDON, S. The M1 and M2 paradigm of macrophage

activation: time for reassessment. **F1000Prime Reports**, v. 6, n. March, p. 1–13, 3 mar. 2014.

MAVERAKIS, E. *et al.* Metastatic melanoma – A review of current and future

treatment options. **Acta Dermato-Venereologica**, v. 95, n. 5, p. 516–524, 2015.

MCCOURT, C.; DOLAN, O.; GORMLEY, G. Malignant melanoma: A pictorial review.

Ulster Medical Journal, v. 83, n. 2, p. 103–110, 2014.

- MCGARY, E. C.; CHELOUCHE LEV, D.; BAR-ELI, M. Cellular adhesion pathways and metastatic potential of human melanoma. **Cancer Biology and Therapy**, v. 1, n. 5, p. 459–465, 2002.
- MELIS, C.; ROGIERS, A.; BECHTER, O.; OORD, J. J. VAN DEN. Molecular genetic and immunotherapeutic targets in metastatic melanoma. **Virchows Archiv**, v. 471, n. 2, p. 281–293, 2017.
- MENDES MARQUES, M. L.; PRESA, F. B.; SILVA VIANA, R. L.; PEREIRA COSTA, M. S. S.; ROCHA AMORIM, M. O.; BELLAN, D. L.; CHAGAS FAUSTINO ALVES, M. G.; COSTA, L. S.; TRINDADE, E. S.; OLIVEIRA ROCHA, H. A. Anti-thrombin, anti-adhesive, anti-migratory, and anti-proliferative activities of sulfated galactans from the tropical green seaweed, *udotea flabellum*. **Marine Drugs**, v. 17, n. 1, 2019.
- MENG, Y.; QU, Y.; WU, W.; CHEN, L.; SUN, L.; TAI, G.; ZHOU, Y.; CHENG, H. Galactan isolated from *Cantharellus cibarius* modulates antitumor immune response by converting tumor-associated macrophages toward M1-like phenotype. **Carbohydrate Polymers**, v. 226, n. July, p. 115295, 2019.
- MENYHÁRT, O.; HARAMI-PAPP, H.; SUKUMAR, S.; SCHÄFER, R.; MAGNANI, L.; BARRIOS, O. DE; GYŐRFFY, B. Guidelines for the selection of functional assays to evaluate the hallmarks of cancer. **Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer**, v. 1866, n. 2, p. 300–319, 2016.
- MICHEL, T.; HENTGES, F.; ZIMMER, J. Consequences of the crosstalk between monocytes/macrophages and natural killer cells. **Frontiers in Immunology**, v. 3, n. JAN, p. 1–6, 2012.
- MICHIELIN, O.; AKKOOI, A. C. J. VAN; ASCIERTO, P. A.; DUMMER, R.; KEILHOLZ, U. Cutaneous melanoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. **Annals of Oncology**, v. 30, n. 12, p. 1884–1901, 2019.
- MILLER, K. D.; NOGUEIRA, L.; MARIOTTO, A. B.; ROWLAND, J. H.; YABROFF, K. R.; ALFANO, C. M.; JEMAL, A.; KRAMER, J. L.; SIEGEL, R. L. Cancer treatment and survivorship statistics, 2019. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 69, n. 5, p. 363–385, 2019.
- MITTAL, D.; GUBIN, M. M.; SCHREIBER, R. D.; SMYTH, M. J. Mittal D, Gubin MM, Schreiber RD, Smyth MJ. New insights into cancer immunoediting and its three component phases—elimination, equilibrium and escape. *Current opinion in immunology*. 2014 Apr 1;27:16-25. **Curr Opin Immunol**, v. 27, p. 16–25, 2014.

- MITTAL, M.; SIDDIQUI, M. R.; TRAN, K.; REDDY, S. P.; MALIK, A. B. Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 20, n. 7, p. 1126–1167, 2014.
- MORAN, B.; SILVA, R.; PERRY, A. S.; GALLAGHER, W. M. Epigenetics of malignant melanoma. **Seminars in Cancer Biology**, n. October, p. 0–1, 2017.
- MOREMEN, K. W.; TIEMEYER, M.; NAIRN, A. V. Vertebrate protein glycosylation: Diversity, synthesis and function. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 13, n. 7, p. 448–462, 2012.
- MORRISON, B. E.; PARK, S. J.; MOONEY, J. M.; MEHRAD, B. Chemokine-mediated recruitment of NK cells is a critical host defense mechanism in invasive aspergillosis. **Journal of Clinical Investigation**, v. 112, n. 12, p. 1862–1870, 2003.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 1983.
- MOSSER, D. M.; EDWARDS, J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, n. 12, p. 958–969, dez. 2008.
- MOTT, J. D.; WERB, Z. Regulation of matrix biology by matrix metalloproteinases. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 16, n. 5, p. 558–564, out. 2004.
- MYERS, M. J.; DEEVER, C. M.; LEWANDOWSKI, A. J. Molecular mechanism of action responsible for carrageenan-induced inflammatory response. **Molecular Immunology**, v. 109, n. February, p. 38–42, 2019.
- NA, T. Y.; SCHECTERSON, L.; MENDONSA, A. M.; GUMBINER, B. M. The functional activity of E-cadherin controls tumor cell metastasis at multiple steps. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 117, n. 11, p. 5931–5937, 2020.
- NAJAFI, M.; HASHEMI GORADEL, N.; *et al.* Macrophage polarity in cancer: A review. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 120, n. 3, p. 2756–2765, 2019.
- NAJAFI, M.; GORADEL, N. H.; FARHOOD, B.; SALEHI, E.; SOLHJOO, S.; TOOLEE, H.; KHARAZINEJAD, E.; MORTEZAEE, K. Tumor microenvironment: Interactions and therapy. **Journal of Cellular Physiology**, v. 234, n. 5, p. 5700–5721, 2019.
- NARAYANAN, D. L.; SALADI, R. N.; FOX, J. L. Ultraviolet radiation and skin cancer. **International journal of dermatology**, v. 49, n. 9, p. 978–86, set. 2010.
- NAUTS, H. C.; SWIFT, W. E.; COLEY, B. L. The Treatment of Malignant Tumors by Bacterial Toxins as Developed by the Late William B. Coley, M.D., Reviewed in

the Light of Modern Research The Treatment of Malignant Tumors by Bacterial Toxins as Developed by the Late William B. Coley, M. D. **Cancer Research**, p. 205–216, 1946.

NESBIT, M.; SCHAUER, H.; MILLER, T. H.; HERLYN, M. Low-Level Monocyte Chemoattractant Protein-1 Stimulation of Monocytes Leads to Tumor Formation in Nontumorigenic Melanoma Cells. **The Journal of Immunology**, v. 166, n. 11, p. 6483–6490, 2001.

NISTICÒ, P.; BISSELL, M. J.; RADISKY, D. C. Epithelial-mesenchymal transition: General principles and pathological relevance with special emphasis on the role of matrix metalloproteinases. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 4, n. 2, p. 1–11, 2012.

NIXON, N. A.; BLAIS, N.; ERNST, S.; KOLLMANNBERGER, C.; BEBB, G.; BUTLER, M.; SMYLYE, M.; VERMA, S. Current landscape of immunotherapy in the treatment of solid tumours, with future opportunities and challenges. **Current Oncology**, v. 25, n. 5, p. e373–e384, 2018.

NOWELL, P. C. The clonal evolution of tumor cell populations. **Science**, v. 194, n. 4260, p. 23–8, 1976.

OHTSUBO, K.; MARTIN, J. D. Glycosylation in Cellular Mechanisms of Health and Disease. **Cell**, v. 126, n. 5, p. 855–867, 2006.

OLIVEIRA-CARVALHO, M. DE F. DE; OLIVEIRA, M. C.; PEREIRA, S. M. B.; VERBRUGGEN, H. Phylogenetic analysis of *Codium* species from Brazil, with the description of the new species *C. pernambucensis* (Bryopsidales, Chlorophyta). **European Journal of Phycology**, v. 47, n. 4, p. 355–365, 2012.

OVERWIJK, W. W.; RESTIFO, N. P. B16 as a Mouse Model for Human Melanoma. *In: Current Protocols in Immunology*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2001. p. 1–33.

PACHMAYR, E.; TREESE, C.; STEIN, U. Underlying Mechanisms for Distant Metastasis - Molecular Biology. **Visceral Medicine**, v. 33, n. 1, p. 11–20, 2017.

PANDYA, P. H.; MURRAY, M. E.; POLLOK, K. E.; RENBARGER, J. L. The Immune System in Cancer Pathogenesis: Potential Therapeutic Approaches. **Journal of Immunology Research**, v. 2016, 2016.

PASSARELLI, A.; MANNAVOLA, F.; STUCCI, L. S.; TUCCI, M.; SILVESTRIS, F. Immune system and melanoma biology: A balance between immunosurveillance and immune escape. **Oncotarget**, v. 8, n. 62, p. 106132–106142, 2017.

- PATEL, S. Therapeutic importance of sulfated polysaccharides from seaweeds: updating the recent findings. **3 Biotech**, v. 2, n. 3, p. 171–185, 2012.
- PATHRIA, P.; LOUIS, T. L.; VARNER, J. A. Targeting Tumor-Associated Macrophages in Cancer. **Trends in Immunology**, v. 40, n. 4, p. 310–327, 2019.
- PEARCE, O. M. T.; LÄUBLI, H. Sialic acids in cancer biology and immunity. **Glycobiology**, v. 26, n. 2, p. 111–128, 2015.
- PEIXOTO, A.; RELVAS-SANTOS, M.; AZEVEDO, R.; LARA SANTOS, L.; FERREIRA, J. A. Protein glycosylation and tumor microenvironment alterations driving cancer hallmarks. **Frontiers in Oncology**, v. 9, n. MAY, p. 1–24, 2019.
- PENCHEVA, N.; BUSS, C. G.; POSADA, J.; MERGHOUB, T.; TAVAZOIE, S. F. Broad-spectrum therapeutic suppression of metastatic melanoma through nuclear hormone receptor activation. **Cell**, v. 156, n. 5, p. 986–1001, 2014.
- PEREIRA, L. Biological and therapeutic properties of the seaweed polysaccharides. **International Biology Review**, v. 2, n. 2, p. 1–50, 2018.
- PEREZ, M. C.; ZAGER, J. S.; AMATRUDA, T.; CONRY, R.; ARIYAN, C.; DESAI, A.; KIRKWOOD, J. M.; TREICHEL, S.; COHAN, D.; RASKIN, L. Observational study of talimogene laherparepvec use for melanoma in clinical practice in the United States (COSMUS-1). **Melanoma Management**, v. 6, n. 2, p. MMT19, 2019.
- PINHO, S. S.; REIS, C. A. Glycosylation in cancer: Mechanisms and clinical implications. **Nature Reviews Cancer**, v. 15, n. 9, p. 540–555, 2015.
- POMIN, V. H. Structural and functional insights into sulfated galactans : a systematic review. p. 1–12, 2010.
- POMIN, V. H.; MULLOY, B. Glycosaminoglycans and proteoglycans. **Pharmaceuticals**, v. 11, n. 1, p. 1–9, 2018.
- PRYDZ, K.; DALEN, K. T. Synthesis and sorting of proteoglycans. **Journal of Cell Science**, v. 113, n. 2, p. 193–205, 2000.
- QUINTERO-FABIÁN, S.; ARREOLA, R.; BECERRIL-VILLANUEVA, E.; TORRES-ROMERO, J. C.; ARANA-ARGÁEZ, V.; LARA-RIEGOS, J.; RAMÍREZ-CAMACHO, M. A.; ALVAREZ-SÁNCHEZ, M. E. Role of Matrix Metalloproteinases in Angiogenesis and Cancer. **Frontiers in Oncology**, v. 9, n. 5, p. 558–564, 6 dez. 2019.
- RABBIE, R.; FERGUSON, P.; MOLINA-AGUILAR, C.; ADAMS, D. J.; ROBLES-ESPINOZA, C. D. Melanoma subtypes: genomic profiles, prognostic molecular markers and therapeutic possibilities. **Journal of Pathology**, v. 247, n. 5, p. 539–

551, 2019.

RAPOSO, M. F. DE J.; MORAIS, A. M. B. DE; MORAIS, R. M. S. C. DE. Marine Polysaccharides from Algae with Potential Biomedical Applications. **Marine Drugs**, v. 13, n. 5, p. 2967–3028, 15 maio 2015.

REITSMA, S.; SLAAF, D. W.; VINK, H.; ZANDVOORT, M. A. M. J. VAN; OUDE EGBRINK, M. G. A. The endothelial glycocalyx: Composition, functions, and visualization. **Pflugers Archiv European Journal of Physiology**, v. 454, n. 3, p. 345–359, 2007.

RICHARDS, D. M.; HETTINGER, J.; FEUERER, M. Monocytes and macrophages in cancer: Development and functions. **Cancer Microenvironment**, v. 6, n. 2, p. 179–191, 2013.

ROCA-LEMA, D.; MARTINEZ-IGLESIAS, O.; ANA PORTELA, C. F. DE; RODRÍGUEZ-BLANCO, A.; VALLADARES-AYERBES, M.; DÍAZ-DÍAZ, A.; CASAS-PAIS, A.; PREGO, C.; FIGUEROA, A. In vitro anti-proliferative and anti-invasive effect of polysaccharide-rich extracts from *trametes versicolor* and *grifola frondosa* in colon cancer cells. **International Journal of Medical Sciences**, v. 16, n. 2, p. 231–240, 2019.

ROGIERS, A.; BOEKHOUT, A.; SCHWARZE, J. K.; AWADA, G.; BLANK, C. U.; NEYNS, B.; GUPTA, S. C. Long-Term Survival, Quality of Life, and Psychosocial Outcomes in Advanced Melanoma Patients Treated with Immune Checkpoint Inhibitors. **Journal of Oncology**, v. 2019, 2019.

ROSALES, C.; URIBE-QUEROL, E. Phagocytosis: A Fundamental Process in Immunity. **BioMed Research International**, v. 2017, 2017.

ROSSI, G. R.; TRINDADE, E. S.; SOUZA-FONSECA-GUIMARAES, F. Tumor Microenvironment-Associated Extracellular Matrix Components Regulate NK Cell Function. **Frontiers in Immunology**, v. 11, n. January, p. 1–10, 2020.

ROTH, G. A. *et al.* Global, regional, and national age-sex-specific mortality for 282 causes of death in 195 countries and territories, 1980–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. **The Lancet**, v. 392, n. 10159, p. 1736–1788, 2018.

ROTHSCHILD, B. M.; TANKE, D. H.; HELBLING, M.; MARTIN, L. D. Epidemiologic study of tumors in dinosaurs. **Naturwissenschaften**, v. 90, n. 11, p. 495–500, 2003.

SAE-LAO, T.; TOHTONG, R.; BATES, D. O.; WONGPRASERT, K. Sulfated Galactans from Red Seaweed *Gracilaria fisheri* Target EGFR and Inhibit

- Cholangiocarcinoma Cell Proliferation. **American Journal of Chinese Medicine**, v. 45, n. 3, p. 615–633, 2017.
- SANTANA-FILHO, A. P. DE; NOLETO, G. R.; GORIN, P. A. J.; SOUZA, L. M. DE; IACOMINI, M.; SASSAKI, G. L. GC–MS detection and quantification of lipopolysaccharides in polysaccharides through 3-O-acetyl fatty acid methyl esters. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, n. 4, p. 2730–2734, mar. 2012.
- SATHE, P. *et al.* Innate immunodeficiency following genetic ablation of Mcl1 in natural killer cells. **Nature Communications**, v. 5, 2014.
- SCHILITZ, A. O. C.; LIMA, F. C. DA S.; OLIVEIRA, J. F. P.; SANTOS, M. DE O.; REBELO, M. S. **Estimativas 2020 - Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, 2020.
- SCHINDELIN, J. *et al.* Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. **Nature Methods**, v. 9, n. 7, p. 676–682, 2012.
- SCHREIBER, R. D.; OLD, L. J.; SMYTH, M. J. Cancer immunoediting: Integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. **Science**, v. 331, n. 6024, p. 1565–1570, 2011.
- SCHULTZ, M. J.; SWINDALL, A. F.; BELLIS, S. L. Regulation of the metastatic cell phenotype by sialylated glycans. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 31, n. 3–4, p. 501–518, 2012.
- SEIDEL, J. A.; OTSUKA, A.; KABASHIMA, K. Anti-PD-1 and anti-CTLA-4 therapies in cancer: Mechanisms of action, efficacy, and limitations. **Frontiers in Oncology**, v. 8, n. MAR, p. 1–14, 2018.
- SELIGER, B.; WOLLSCHIED, U.; MOMBURG, F.; BLANKENSTEIN, T.; HUBER, C. Characterization of the major histocompatibility complex class I deficiencies in B16 melanoma cells. **Cancer Research**, v. 61, n. 3, p. 1095–1099, 2001.
- SHAIN, A. H.; BASTIAN, B. C. From melanocytes to melanomas. **Nat Rev Cancer**, v. 16, n. 6, p. 345–358, 2016.
- SHANKARAN, V.; IKEDA, H.; BRUCE, A. T.; WHITE, J. M.; SWANSON, P. E.; OLD, L. J.; SHREIBER, R. D. IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. **Nature**, v. 410, n. 6832, p. 1107–11, 2001.
- SHARMA, A.; KUZU, O. F.; NGUYEN, F. D.; SHARMA, A.; NOORY, M. Current State of Animal (Mouse) Modeling in Melanoma Research. **Cancer Growth and Metastasis**, v. 8, p. 81, 2015.

- SHARMA, V.; MCNEILL, J. H. To scale or not to scale: The principles of dose extrapolation. **British Journal of Pharmacology**, v. 157, n. 6, p. 907–921, 2009.
- SHI, C.; PAMER, E. G. Monocyte recruitment during infection and inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n. 11, p. 762–774, 2011.
- SHIELDS IV, C. W.; EVANS, M. A.; WANG, L. L.; BAUGH, N.; IYER, S.; WU, D.; ZHAO, Z.; PUSULURI, A.; UKIDVE, A.; PAN, D. C.; MITRAGOTRI, S. Cellular backpacks for macrophage immunotherapy. n. April, p. 1–12, 2020.
- SHIN, M. J.; KIM, YOUNG SOOK; KWAK, Y. S.; SONG, Y. B.; KIM, YOUNG SANG; PARK, J. D. Enhancement of antitumor effects of paclitaxel (taxol) in combination with red ginseng acidic polysaccharide (RGAP). **Planta Medica**, v. 70, n. 11, p. 1033–1038, 2004.
- SHULTZ, L. D.; BREHM, M. A.; VICTOR GARCIA-MARTINEZ, J.; GREINER, D. L. Humanized mice for immune system investigation: Progress, promise and challenges. **Nature Reviews Immunology**, v. 12, n. 11, p. 786–798, 2012.
- ŠKOVIEROVÁ, H.; OKAJČEKOVÁ, T.; STRNÁDEL, J.; VIDOMANOVÁ, E.; HALAŠOVÁ, E. Molecular regulation of epithelial-to-mesenchymal transition in tumorigenesis (Review). **International Journal of Molecular Medicine**, v. 41, n. 3, p. 1187–1200, 2018.
- STEEG, P. S. Targeting metastasis. **Nature Publishing Group**, v. 16, n. 4, p. 201–218, 2016.
- STRATTON, M. R.; CAMPBELL, P. J.; FUTREAL, P. A. The cancer genome. **Nature**, v. 458, n. 7239, p. 719–724, abr. 2009.
- SUDHAKAR, A. History of Cancer, Ancient and Modern Treatment Methods Akulapalli. **J Cancer Sci Ther.**, v. 1, n. 2, p. 1–4, 2010.
- SURAYOT, U.; YOU, S. G. Structural effects of sulfated polysaccharides from *Codium fragile* on NK cell activation and cytotoxicity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 98, p. 117–124, 2017.
- TAKEDA, K.; AKIRA, S. Toll-like receptors in innate immunity. **International Immunology**, v. 17, n. 1, p. 1–14, 2005.
- TAN, H.; WANG, N.; LI, S.; HONG, M.; WANG, X.; FENG, Y. The Reactive Oxygen Species in Macrophage Polarization : Human Diseases. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, p. 1–16, 2016.
- TEIMOURI, F.; NIKFAR, S.; ABDOLLAHI, M. Efficacy and side effects of dacarbazine in comparison with temozolomide in the treatment of malignant melanoma: A meta-

analysis consisting of 1314 patients. **Melanoma Research**, v. 23, n. 5, p. 381–389, 2013.

THIERY, J. P.; ACLOQUE, H.; HUANG, R. Y. J.; NIETO, M. A. Epithelial-Mesenchymal Transitions in Development and Disease. **Cell**, v. 139, n. 5, p. 871–890, 2009.

TOMASETTI, C.; MARCHIONNI, L.; NOWAK, M. A.; PARMIGIANI, G.; VOGELSTEIN, B. Only three driver gene mutations are required for the development of lung and colorectal cancers. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 1, p. 118–123, 2015.

TSUCHIYAMA, T.; NAKAMOTO, Y.; SAKAI, Y.; MARUKAWA, Y.; KITAHARA, M.; MUKAIDA, N.; KANEKO, S. Prolonged, NK Cell-Mediated Antitumor Effects of Suicide Gene Therapy Combined with Monocyte Chemoattractant Protein-1 against Hepatocellular Carcinoma. **The Journal of Immunology**, v. 178, n. 1, p. 574–583, 2007.

URRUTICOECHEA, A.; ALEMANY, R.; BALART, J.; VILLANUEVA, A.; VIÑALS, F.; CAPELLÁ, G. Recent Advances in Cancer Therapy: An Overview. **Current Pharmaceutical Design**, v. 16, p. 3–10, 2010.

VACCHELLI, E. *et al.* Trial Watch—Immunostimulation with cytokines in cancer therapy. **Oncolimmunology**, v. 5, n. 2, p. 1–12, 2016.

VAIOPOULOS, A. G.; ATHANASOULA, K. C.; PAPAVALASSILIOU, A. G. Epigenetic modifications in colorectal cancer: molecular insights and therapeutic challenges. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1842, n. 7, p. 971–80, jul. 2014.

VALASTYAN, S.; WEINBERG, R. A. Tumor Metastasis: Molecular Insights and Evolving Paradigms. **Cell**, v. 147, n. 2, p. 275–292, out. 2011.

VETVICKÁ, V.; VANNUCCI, L.; SIMA, P.; RICHTER, J. Beta glucan: Supplement or drug? From laboratory to clinical trials. **Molecules**, 2019.

VIEYRA-LOBATO, M. R.; VELA-OJEDA, J.; MONTIEL-CERVANTES, L.; LÓPEZ-SANTIAGO, R.; MORENO-LAFONT, M. C. Description of CD8⁺ regulatory T lymphocytes and their specific intervention in Graft-versus-Host and infectious diseases, autoimmunity, and cancer. **Journal of Immunology Research**, v. 2018, 2018.

VISWANATH, P.; PENG, S.; SINGH, R.; KINGSLEY, C.; BALTER, P. A.; JOHNSON, F. M. A Novel Method for Quantifying Total Thoracic Tumor Burden in Mice. **Neoplasia (United States)**, v. 20, n. 10, p. 975–984, 2018.

- WANG, J.; LI, W.; HUANG, X.; LIU, Y.; LI, Q.; ZHENG, Z. A polysaccharide from *Lentinus edodes* inhibits human colon cancer cell proliferation and suppresses tumor growth in athymic nude mice. 2016.
- WANG, M. *et al.* Role of tumor microenvironment in tumorigenesis. **Journal of Cancer**, v. 8, n. 5, p. 761–773, 2017.
- WARD, W. H.; FARMA, J. M. **Cutaneous Melanoma: Etiology and Therapy**. [s.l.: Codon Publications, 2017. v. 6
- WEI, S. C.; DUFFY, C. R.; ALLISON, J. P. Fundamental mechanisms of immune checkpoint blockade therapy. **Cancer Discovery**, v. 8, n. 9, p. 1069–1086, 2018.
- WEI, W.; LI, Z. P.; BIAN, Z. X.; HAN, Q. BIN. Astragalus polysaccharide RAP induces macrophage phenotype polarization to M1 via the notch signaling pathway. **Molecules**, v. 24, n. 10, p. 1–13, 2019.
- WHITESIDE, T. L. The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth. **Oncogene**, v. 27, n. 45, p. 5904–5912, 6 out. 2008.
- WILD, C. P.; WEIDERPASS, E.; STEWART, B. W. **World cancer report 2020**. [s.l.: s.n.].
- WINKELMANN, C. T.; FIGUEROA, S. D.; ROLD, T. L.; VOLKERT, W. A.; HOFFMAN, T. J. Microimaging characterization of a B16-F10 melanoma metastasis mouse model. **Molecular Imaging**, v. 5, n. 2, p. 105–114, 2006.
- WOLCHOK, J. D.; SAENGER, Y. The Mechanism of Anti-CTLA-4 Activity and the Negative Regulation of T-Cell Activation. **The Oncologist**, v. 13, n. S4, p. 2–9, 2008.
- YAN, J.; MENG, Y.; ZHANG, M.; ZHOU, X.; CHENG, H.; SUN, L.; ZHOU, Y. A 3-O-methylated heterogalactan from *Pleurotus eryngii* activates macrophages. **Carbohydrate Polymers**, v. 206, n. August 2018, p. 706–715, 2019.
- YAN, L.; ROSEN, N.; ARTEAGA, C. Targeted cancer therapies. **Chinese Journal of Cancer**, v. 30, n. 1, p. 1–4, 2011.
- YANG, L.; ZHANG, Y. Tumor-associated macrophages: from basic research to clinical application. **Journal of hematology & oncology**, v. 10, n. 1, p. 58, 2017.
- YANG, Y.-J.; XU, H.-M.; SUO, Y.-R. Raspberry pulp polysaccharides inhibit tumor growth via immunopotential and enhance docetaxel chemotherapy against malignant melanoma in vivo. **Food & function**, v. 6, n. 9, p. 3022–34, 2015.
- YIN, M.; ZHANG, Y.; LI, H. Advances in research on immunoregulation of macrophages by plant polysaccharides. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. FEB, 2019.

- YOSHIMURA, T. The chemokine MCP-1 (CCL2) in the host interaction with cancer: A foe or ally? **Cellular and Molecular Immunology**, v. 15, n. 4, p. 335–345, 2018.
- YU, C.; LIU, X.; YANG, J.; ZHANG, M.; JIN, H.; MA, X.; SHI, H. Combination of immunotherapy with targeted therapy: Theory and practice in metastatic melanoma. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. MAY, 2019.
- YU, Y.; SHEN, M.; SONG, Q.; XIE, J. Biological activities and pharmaceutical applications of polysaccharide from natural resources: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 183, n. 235, p. 91–101, 2018.
- YUAN, H.; MA, Q.; YE, L.; PIAO, G. The traditional medicine and modern medicine from natural products. **Molecules**, v. 21, n. 5, 2016.
- ZAPOROZHETS, T.; BESEDNOVA, N. Prospects for the therapeutic application of sulfated polysaccharides of brown algae in diseases of the cardiovascular system: review. **Pharmaceutical Biology**, v. 54, n. 12, p. 3126–3135, 2016.
- ZHANG, C. *et al.* NKG2A is a NK cell exhaustion checkpoint for HCV persistence. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, 2019.
- ZHANG, D.; WANG, Z.; SHANG, D.; YU, J.; YUAN, S. Incidence and prognosis of brain metastases in cutaneous melanoma patients: A population-based study. **Melanoma Research**, v. 29, n. 1, p. 77–84, 2019.
- ZHANG, M.; CUI, S. W.; CHEUNG, P. C. K.; WANG, Q. Antitumor polysaccharides from mushrooms: a review on their isolation process, structural characteristics and antitumor activity. **Trends in Food Science and Technology**, v. 18, n. 1, p. 4–19, 2007.
- ZHANG, X.; HUO, L.; JIN, H.; HAN, Y.; WANG, J.; ZHANG, Y.; LAI, X.; LE, Z.; ZHANG, J.; HUA, Z. Anti-cancer activity of Annexin V in murine melanoma model by suppressing tumor angiogenesis. **Oncotarget**, v. 8, n. 26, p. 42602–42612, 27 jun. 2017.
- ZHANG, X.; QI, C.; GUO, Y.; ZHOU, W.; ZHANG, Y. Toll-like receptor 4-related immunostimulatory polysaccharides: Primary structure, activity relationships, and possible interaction models. **Carbohydrate Polymers**, v. 149, p. 186–206, 2016.
- ZHENG, B. Z.; LIU, T. D.; CHEN, G.; ZHANG, J. X.; KANG, X. The effect of curcumin on cell adhesion of human esophageal cancer cell. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 22, n. 2, p. 551–560, 2018.
- ZHOU, Z.; ZHANG, C.; ZHANG, J.; TIAN, Z. Macrophages help NK cells to attack tumor cells by stimulatory NKG2D ligand but protect themselves from NK killing by

inhibitory ligand Qa-1. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, 2012.

ZITVOGEL, L.; TESNIERE, A.; KROEMER, G. Cancer despite immunosurveillance: Immunoselection and immunosubversion. **Nature Reviews Immunology**, v. 6, n. 10, p. 715–727, 2006.

ZONG, A.; CAO, H.; WANG, F. Anticancer polysaccharides from natural resources: a review of recent research. **Carbohydrate polymers**, v. 90, n. 4, p. 1395–410, 6 nov. 2012.

ZONG, A.; ZHAO, T.; ZHANG, Y.; SONG, X.; SHI, Y.; CAO, H.; LIU, C.; CHENG, Y.; QU, X.; CAO, J.; WANG, F. Anti-metastatic and anti-angiogenic activities of sulfated polysaccharide of *Sepiella maindroni* ink. **Carbohydrate Polymers**, v. 91, n. 1, p. 403–409, 2013.